Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP04/019461

International filing date: 17 December 2004 (17.12.2004)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2003-420046
Filing date: 17 December 2003 (17.12.2003)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)

World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

18.02.2005

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: ２００３年１２月１７日

出願番号
Application Number: 特願２００３－４２００４６

[ST. 10/C]: ［ＪＰ２００３－４２００４６］

出願人
Applicant(s): サントリー株式会社
サントリーフラワーズ株式会社

２００５年　３月２４日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小川洋

出証番号　出証特２００５－３０２５９６４

【書類名】　特許願
【整理番号】　1034724
【提出日】　平成15年12月17日
【あて先】　特許庁長官　今井　康夫　殿
【国際特許分類】　C12N 15/29
【発明者】
　【住所又は居所】　大阪府三島郡島本町若山台１－１－１　サントリー株式会社　研究センター内
　【氏名】　田中　良和
【発明者】
　【住所又は居所】　大阪府三島郡島本町若山台１－１－１　サントリー株式会社　研究センター内
　【氏名】　小埜　栄一郎
【発明者】
　【住所又は居所】　大阪府三島郡島本町若山台１－１－１　サントリーフラワーズ株式会社　研究センター内
　【氏名】　中村　典子
【発明者】
　【住所又は居所】　大阪府三島郡島本町若山台１－１－１　サントリーフラワーズ株式会社　研究センター内
　【氏名】　水谷　正子
【特許出願人】
　【識別番号】　000001904
　【氏名又は名称】　サントリー株式会社
【特許出願人】
　【識別番号】　502275942
　【氏名又は名称】　サントリーフラワーズ株式会社
【代理人】
　【識別番号】　100099759
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　青木　篤
　【電話番号】　03-5470-1900
【選任した代理人】
　【識別番号】　100077517
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　石田　敬
【選任した代理人】
　【識別番号】　100087871
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　福本　積
【選任した代理人】
　【識別番号】　100082898
　【弁理士】
　【氏名又は名称】　西山　雅也
【手数料の表示】
　【予納台帳番号】　209382
　【納付金額】　21,000円
【提出物件の目録】
　【物件名】　特許請求の範囲　1
　【物件名】　明細書　1

【物件名】　図面　1
【物件名】　要約書　1
【包括委任状番号】　0306634

【書類名】特許請求の範囲
【請求項１】
カルコン類の4’位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子。
【請求項２】
配列番号２に記載のアミノ酸配列を有する請求項１記載の遺伝子。
【請求項３】
配列番号１に記載する塩基配列の一部または全部に対して、５ｘ SSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4’位に糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする請求項１記載の遺伝子。
【請求項４】
配列番号２に記載のアミノ酸配列に対して１個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、カルコン類の4’位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする請求項1に記載の遺伝子。
【請求項５】
配列番号１に記載する塩基配列の一部または全部からなるDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4’位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする請求項１記載の遺伝子。
【請求項６】
ゴマノハグサ科由来である請求項１～５のいずれか１項に記載の遺伝子。
【請求項７】
請求項１～６のいずれか１項に記載の遺伝子を含んでなるベクター。
【請求項８】
請求項７に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞。
【請求項９】
請求項１～６のいずれか１項に記載の遺伝子によってコードされるタンパク質。
【請求項１０】
請求項７に記載の宿主細胞を培養し又は生育させ、当該宿主細胞からカルコン類の4’位に糖を転移する活性を有するタンパク質を採取することを特徴とする該タンパク質の製造方法。
【請求項１１】
請求項１～６のいずれか１項に記載の遺伝子が導入された植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体、またはそれら植物体の組織。
【請求項１２】
請求項１１に記載の植物体の切り花。
【請求項１３】
請求項１～６のいずれか１項に記載の遺伝子を用いてカルコン類の4’位に糖を転移する方法。
【請求項１４】
請求項１～６のいずれか１項に記載の遺伝子を植物体に導入・発現して得られる、花色が改変された当該植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体。
【請求項１５】
花色が黄色味を帯びていることを特徴とする請求項14に記載の植物体。
【請求項１６】
請求項1～６のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、花色を黄色く改変させる方法。
【請求項１７】
請求項1～６のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

【請求項１８】
請求項1～６のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。
【請求項１９】
請求項1～６のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラバノン3－水酸化酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法。

【書類名】明細書
【発明の名称】フラボノイド合成系の制御による黄色の花の作製方法
【技術分野】
【０００１】
本発明はカルコン類に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、および当該遺伝子を利用して花色が変換された植物に関するものである。更に詳しくは、カルコン類の4’配糖体を合成する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、好ましくはキンギョソウのカルコン類の4’配糖体を合成する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子、及びこれらとオーレウシジン合成酵素（以下、ASという）遺伝子を共発現させオーロン類を蓄積させることにより花の色を黄色く改変する手法に関するものである。
【背景技術】
【０００２】
花色は人が花卉を鑑賞あるいは購入する際に重要な形質であり、古くから様々な色の花が育種されてきた。単一の種ですべての色の花をもつ場合はむしろ稀であるが、これは花色として発現する色素の生合成が遺伝的に規定されていることによる。交配育種では利用できる遺伝子資源が交配可能な近縁種に限定されているため、交配によって目的の種においてすべての色の花を作ることは実質的に不可能であった。最近になって、遺伝子組換え技術を利用して、花色素を合成する遺伝子をある植物から取得し、当該遺伝子を別の種で発現することにより花の色を改変することが可能となった(Plant Cell Physiol. 39,1119 (1998)、Curr. Opin. Biotechnol. 12, 155 (2001))。
【０００３】
花の色のうち、橙、赤、紫、青は主にアントシアニンと総称されるフラボノイドに由来する。黄色は、カロチノイド、ベタレインといったフラボノイド以外の化合物に由来することが多いが、一部の植物種の黄色はフラボノイドに由来する。たとえば、黄色カーネーションには4,2’,4’,6’－テトラヒドロキシカルコン（以下THC）の2’配糖体が花弁中に存在することが知られている（Phytochemistry 5,111 (1996)）。また、キンギョソウ、リナリアにはTHCの4’配糖体が存在する。
【０００４】
カルコン類としては、THCのほか、ブテイン、イソリクイチゲニン等及びこれらの誘導体の配糖体が知られており、カーネーション、アサガオ、ボタン、アスター、ムギワラギク、ニチニチソウ、シクラメン、ペチュニアはTHC、キンギョソウやスターチスは3,4,2’,4’,6’－ペンタヒドロキシカルコン、コスモス、キクイモはブテイン、ダリアはブテインおよびイソリクイチゲニンをアグリコンとする配糖体を含んでいる。また、キンギョソウ、リナリア、アサガオなどの限られた種にはオーレウシジン(以下AU)、ブラックテアチンなどのオーロン類と呼ばれる黄色の花色素が存在する。
【０００５】
オーロンの吸収極大は399nmから403nmであるのに対し、カルコンの吸収極大は372nmから382nmであるから、両者の色調は異なり、蛍光のためオーロンのほうが鮮やかな黄色を呈する（バイオホルティ　1　49-57（1990）　誠文堂新光社）。一般にカルコン類、オーロン類、アントシアニンは植物細胞中では配糖体として液胞中に蓄積する。アントシアニンの生合成経路はよく研究されており、アントシアニンの合成に関与する酵素やそれらをコードする遺伝子が知られている（Comprehensive Natural Products Chemistry, vol I (ed. Sankawa) pp713-748, Elsevier, Amsterdam(1999)）。
【０００６】
フラボノイドの生合成経路は高等植物には広く存在しており、また、種間で共通している。THCは、3分子のマロニルCoAと1分子のクマロイルCoAからカルコン合成酵素の触媒作用により生合成される。THCは薄い黄色を呈するが、植物においては、通常カルコン異性化酵素（CHI）により速やかに無色のナリンゲニンに変換される。また、THCは中性付近のｐＨではきわめて不安定であり、自発的に閉環してナリンゲニンに変換する。THCが植物細胞中で安定に存在、すなわち黄色を安定に呈するためには、THCの2’位が糖により修飾さ

れ閉環できなくなることが必要である。この反応はTHCの2’にグルコースを転移する酵素（UDP-グルコース：4,2’,4’,6’－テトラヒドロキシカルコン　2’-糖転移酵素　以下2’CGT）により触媒される。

【０００７】

THC2’配糖体はカーネーション、シクラメンなどに存在することから、2’CGTもこれらの花に存在すると予測される。したがって、2’CGT遺伝子を得る事ができれば、この酵素遺伝子を植物において発現し、THC 2’配糖体を蓄積させ、黄色の花を作成できると考えられていた（Biotechnology of Ornamental Plants,Edited by Geneve, Preece and Merkle,pp259-294, CAB International Wallingford, UK (1997)）。また、THC 2’配糖体を十分蓄積し黄色を発色させるためにはCHI遺伝子が欠損し、THCからナリンゲニンへの酵素的変換が抑制されること、さらに明瞭な黄色の発色のためにはCHI遺伝子と他にフラバノン3-水酸化酵素（以下、F3Hという）遺伝子も欠損する必要があることが知られていた（Plant Cell Physiol. 43, 578 (2002)）。

【０００８】

これまでにカーネーションの2’CGT遺伝子をクローニングしたという報告はある（Plant Cell Physiol. 44, s158 (2003)）がその配列は開示されていない。また、カーネーションから2’CGT活性をコードする遺伝子を取得し、ペチュニアで発現させ、ペチュニア花弁においてTHC 2’配糖体を蓄積した例もある（PCT/JP03/10500）。しかしながら、2’CGTによって生成するTHC 2’配糖体は、その化学構造上、オーロン合成の前駆体となることが不可能となる。また、前述のようにTHC2’配糖体の蓄積では、うすい黄色の花弁にしかならない。

【０００９】

THCの2’位の水酸基がメチル化された化合物が蓄積した場合も花弁は淡い黄色となることは知られているが、このメチル化を触媒する酵素やその遺伝子の実体は知られていない。ダリア、コスモスなどの黄色の品種には6’-デオキシカルコンが含まれる。マメ科植物においては、6’-デオキシカルコンは5-デオキシフラボノイドの前駆体であり、カルコンシンターゼ（CHS）とカルコンリダクターゼ（CHR）の触媒作用により生合成される。ペチュニアにアルファルファのCHR遺伝子を導入したところ、ブテインなどの6’-デオキシカルコン類が生成したことが報告されているが、当該CHR遺伝子を白い花をもつペチュニアに導入した場合、つぼみの段階ではごく薄い黄色が見られたが、開花時にはほとんど白であり、産業上有用な黄色の花を作出するに至らなかった(Plant J. 13, 259 (1998))。

【００１０】

前述のようにカルコン配糖体よりもオーロンのほうが鮮やかな黄色を呈するため、オーロンを蓄積させる方法を開発できれば産業上きわめて有用である。オーロンの生合成に関わる酵素の１つであるASとその遺伝子については既に報告されている(Science, 290, 1163 (2000))。この報告によればASはTHC、ペンタヒドキシカルコン（PHC）や、これらの配糖体を基質としてAU、ブラクテアチンならびにこれらの配糖体を生成する。しかしながら、AS遺伝子を用いてAUやブラックテアチンなどのオーロンを生物において蓄積させた報告はない。

【００１１】

我々はAS遺伝子を構成的プロモーターの制御下に結合したバイナリーベクターを構築し、アグロバクテリウム法によりペチュニアやトレニアにAS遺伝子を導入したが、オーロンの蓄積は認められなかった。一方、アントシアニジンの3位の配糖化がアントシアニンの液胞への移行に必須であると報告されているが（Nature 375, 397 (1995)）、これと同様にオーロンの配糖化が液胞への移行シグナルとして必須である可能性が考えられる。実際に黄色キンギョソウ花弁に蓄積している主要なオーロンはAUの6位の配糖化物である。そこで、AUの6位に配糖化活性を示すGT（AU6GT）を取得し（WO 00/49155）、このAU6GT遺伝子とAS遺伝子を共にペチュニアで構成的に発現させたが、オーロンの蓄積は見られなかった。

【００１２】

フラボノイドやアントシアニンの生合成に関与する酵素は細胞内では細胞質か小胞体に存在すると考えられている。これらの酵素の働きでフラボノイドやアントシアニンは液胞の外側、すなわち細胞質側で合成され、配糖化された後、液胞に輸送される(Natural Product Reports 20, 288, (2003))。ところが、鋭意検討の結果、ASは例外的に液胞内に存在することを本発明者らは明らかにした。このことから生体内では、配糖化されたカルコンが液胞に輸送され、これを基質として液胞内でオーロンが合成されるのではないかという着想を得た。

【００１３】

前述のように黄色キンギョソウ花弁の液胞に蓄積する主要なオーロンはAU 6位配糖化物である。AUの6位はTHCの4'位に対応し、黄色キンギョソウ花弁にはTHC 4'配糖体も存在する。これらに基づき、細胞質で合成されたTHCの4'位が配糖化された後、液胞に輸送され、それを基質としてASによってAU 6位配糖化物が合成されるという一連のオーロン合成経路を推測するにいたった。よってAU 6位配糖化物などのオーロンを異種植物で合成させるためには、THC4'配糖体を合成することが必須であると考えた。そのためには、THCの4'位を配糖化するUDP-グルコース：4,2',4',6'－テトラヒドロキシカルコン4'配糖化酵素、以下4'CGT)が必要であり、4'CGT遺伝子を取得する必要がある。しかしながら、4'CGT遺伝子は今までにクローニングされた報告もなく、4'CGTが単離された報告もない。

【００１４】

フラボノイドをはじめ多様な化合物の糖転移反応を触媒して配糖体を生成する酵素は、一般に糖転移酵素(GT)と呼ばれ、植物は、基質及び転移する糖の種類に対応した多様な分子種のGTおよびそれらをコードする遺伝子を持っている。GTは通常UDP-グルコースをグルコース供与体として利用するので、そのアミノ酸配列中にUDP-グルコースに結合するモチーフを含んでいる (Plant Physiol. 112, 446 (2001))。このモチーフを有するGT遺伝子は、すでにゲノムの全構造が明らかになっているアラビドプシスには99種あることが知られている (J.Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。

【００１５】

また他の植物からも、いくつかのGTのアミノ酸配列と機能が解明されている。フラボノイドあるいはアントシアニジンの3位の水酸基に糖を転移する反応を触媒する酵素 (UDP-グルコース：フラボノイド3-糖転移酵素、以下3GT) の遺伝子は、シソ、トウモロコシ、リンドウ、ブドウなどから得られている (J. Biol. Chem. 274 , 7405 (1999); J.Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。また、アントシアニンの5位の水酸基に糖を転移する反応を触媒する酵素 (UDP-グルコース：アントシアニン5-糖転移酵素、以下5GT) の遺伝子は、シソ、バーベナなどから得られている(J. Biol. Chem., 274, 7405, (1999))。

【００１６】

３GTや5GTのアミノ酸配列の解析から、同一機能を有するGTは植物種が異なっていてもアミノ酸配列は類似していること、すなわちファミリーを形成することが知られている (J.Biol. Chem. 276, 4338, (2001))。よって、既知のGTと同一機能を有する酵素 (オルソログ) を他の植物種から得る事は、現在の技術水準からすれば困難ではない。たとえば、ペチュニアの5GT遺伝子は、シソの5GT遺伝子を用いてクローニングされた (Plant Mol Biol. 48, 401 (2002).)。しかしながら、同一の機能を有する酵素が全く得られていない新規GT遺伝子の取得には多大の試行錯誤と困難が伴う。

【００１７】

前述のように全ゲノム構造が明らかになっているアラビドプシスであるが、その花弁は白く、カルコン4'配糖体の蓄積は報告されていない。したがって、アラビドプシスのGT遺伝子の情報を利用して4'CGT遺伝子のクローニングを行うことはできない。また、カーネーションから2'CGTが単離 (PCT/JP03/10500) されているが、4'CGT遺伝子と2'CGTの相同性が高いことは必ずしも期待できない。なぜならば、基質が共通であっても糖を付加する位置が異なれば、それぞれのGTの生化学的および分子生物学的特性は大きく異なる可能性が考えられるからである。これは、3GTと5GTが別のGTファミリーに属することによっ

ても支持される。また、ベタニジンの5GTと6GTは基質が共通にも関わらず、アミノ酸同一性は19％しかないことが報告されている（Planta 214, 492 (2002)）。

【００１８】

事実、共通のアントシアニジン骨格の3位、5位または3’位に糖を転移する各GTは、GTスーパーファミリーの中の異なるファミリーに属し、これらのファミリー間のアミノ酸同一性は20％程度に過ぎない（Plant Physiol. 132, 1652, (2003)，Natural Product Reports 20, 288, (2003)）。4’CGT 遺伝子のみならず、新規の遺伝子を取得するには一般にいくつかの方法が考えられる。たとえば花弁で発現しているバラの香り成分の合成に関与する酵素の遺伝子は、遺伝子を網羅的に配列決定し、それらの構造、発現様式、大腸菌での発現によって同定された（Plant Cell. 14, 2325 (2002)）。そこで4’CGT 遺伝子を同定するためにオーロンおよびカルコン４’配糖体を蓄積する黄色キンギョソウ（品種バタフライイエロー）花弁由来のｃＤＮＡライブラリーからランダムに5000クローンを選び、これらの塩基配列を決定した。

【００１９】

公知のDNAデータベースを用いたホモロジー検索の結果、3種のGT遺伝子が得られた。そのうち2種は３GT遺伝子および前述の、AU6GTをコードする遺伝子（WO 00/49155）、残る1種が新規GT(pSPB662と命名)であった（配列番号：13）。しかし、pSPB662にコードされるGTはTHCに対する配糖化活性を示さず、THC4’GTではないことが明らかとなった。また、前述のように同遺伝子とオーロン合成酵素遺伝子とを共にペチュニアにおいて高発現させた結果、カルコン配糖体およびオーロンの生成は確認されず、花色についても変化は認められなかった。これらの結果から、5000クローン程度のランダムスクリーニングによってはカルコン配糖化酵素遺伝子を単離できないことが示唆され、4’CGT 遺伝子を取得するのは、困難であった。

【００２０】

【特許文献１】PCT/JP03/10500
【特許文献２】WO 00/49155

【００２１】

【非特許文献１】Plant Cell Physiol. 39,1119 (1998)
【非特許文献２】Curr. Opin. Biotechnol. 12, 155 (2001)
【非特許文献３】Phytochemistry 5,111 (1996)
【非特許文献４】バイオホルティ　1　49-57 (1990)　誠文堂新光社
【非特許文献５】Comprehensive Natural Products Chemistry, vol I (ed. Sankawa) pp713-748, Elsevier, Amsterdam(1999)
【非特許文献６】Biotechnology of Ornamental Plants,Edited by Geneve, Preece and Merkle,pp259-294, CAB International Wallingford, UK (1997)
【非特許文献７】Plant Cell Physiol. 43, 578 (2002)
【非特許文献８】Plant Cell Physiol. 44, s158 (2003)
【非特許文献９】Plant J. 13, 259 (1998)

【００２２】

【非特許文献１０】Science, 290, 1163 (2000)
【非特許文献１１】Nature 375, 397 (1995)
【非特許文献１２】Natural Product Reports 20, 288, (2003)
【非特許文献１３】Plant Physiol. 112, 446 (2001)
【非特許文献１４】J.Biol. Chem. 276, 4338, (2001)
【非特許文献１５】J. Biol. Chem. 274 , 7405 (1999)
【非特許文献１６】Plant Mol Biol. 48, 401 (2002)
【非特許文献１７】Planta 214, 492 (2002)
【非特許文献１８】Plant Physiol. 132, 1652,2003 (2003)
【非特許文献１９】Plant Cell. 14, 2325 (2002)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【００２３】

本発明は、カルコン類の4’位の水酸基に糖を転移する活性を有するタンパク質及びその遺伝子、好ましくはカルコン類の4’位の水酸基に特異的に糖を転移する活性を有するタンパク質及びその遺伝子を提供することにある。さらに当該GT遺伝子を用いて花色を改変、好ましくは黄色に変化させた植物体を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【００２４】

前述のように、4’CGTの生化学的あるいは分子生物学的な性質は知られておらず、酵素が精製されたり、その遺伝子がクローニングされたこともなかった。発明者らは、黄色キンギョソウ（バタフライイエロー）の花弁cDNAライブラリーからGTファミリーの保存アミノ酸配列に対応した塩基配列を有するプローブを用いて、当該保存アミノ酸配列の塩基配列を有するGT遺伝子を数十種類取得した。さらに、当該GT遺伝子群を各々大腸菌で発現させ、その中に、当該大腸菌の抽出液中にカルコンの4’位にグルコースを転移する活性、すなわち4’CGT活性を確認し、クローン化した遺伝子が4’CGTをコードすることを確認した。この遺伝子を植物中で発現させ、花色を改変し、本発明を完成した。

【００２５】

すなわち、本発明は、（１）カルコン類の4’位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子を提供する。

本発明はまた、（２）配列番号２に記載のアミノ酸配列を有する前記（１）記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（３）配列番号１に記載する塩基配列の一部または全部に対して、５ｘSSC、50℃の条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4’位に糖を転移する活性を有する蛋白質をコードする前記（１）記載の遺伝子を提供する。

【００２６】

本発明はまた、（４）配列番号２に記載のアミノ酸配列に対して１個又は複数個のアミノ酸の付加、欠失及び／又は他のアミノ酸による置換によって修飾されているアミノ酸配列を有し、カルコン類の4’位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする前記（１）に記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（５）配列番号１に記載する塩基配列の一部または全部からなるDNAとストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつカルコン類の4’位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする前記（１）記載の遺伝子を提供する。

本発明はまた、（６）ゴマノハグサ科由来である前記（１）～（５）のいずれか１項に記載の遺伝子を提供する。

【００２７】

本発明はまた、（７）前記（１）～（６）のいずれか１項に記載の遺伝子を含んでなるベクターを提供する。

本発明はまた、（８）前記（７）に記載のベクターにより形質転換された宿主細胞を提供する。

本発明はまた、（９）前記（１）～（６）のいずれか１項に記載の遺伝子によってコードされるタンパク質を提供する。

本発明はまた、(10) 前記（７）に記載の宿主細胞を培養し又は生育させ、当該宿主細胞からカルコン類の4’位に糖を転移する活性を有するタンパク質を採取することを特徴とする該タンパク質の製造方法を提供する。

本発明はまた、(11) 前記（１）～（６）のいずれか１項に記載の遺伝子が導入された植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体、またはそれら植物体の組織を提供する。

【００２８】

本発明はまた、(12) 前記 (11) に記載の植物体の切り花を提供する。

本発明はまた、(13) 前記（１）～（６）のいずれか１項に記載の遺伝子を用いてカル

コン類の4’位に糖を転移する方法を提供する。
本発明はまた、（14）前記（１）～（６）のいずれか１項に記載の遺伝子を植物体に導入・発現して得られる、花色が改変された当該植物体もしくは当該植物体と同一の性質を有する該植物体の子孫となる植物体を提供する。
本発明はまた、（15）花色が黄色味を帯びていることを特徴とする前記（14）に記載の植物体を提供する。
【００２９】
本発明はまた、（16）前記（1）～（６）のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、花色を黄色く改変させる方法を提供する。
本発明はまた、（17）前記（1）～（６）のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。
本発明はまた、（18）前記（1）～（６）のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のジヒドロフラボノール還元酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。
本発明はまた、（19）前記（1）～（６）のいずれか1項に記載の遺伝子と共にオーレウシジン合成酵素をコードする遺伝子を植物体に導入、発現させ、さらに宿主のフラバノン3－水酸化酵素遺伝子の発現を抑制することによって花色を黄色く改変させる方法を提供する。
【発明を実施するための最良の形態】
【００３０】
本発明の遺伝子としては、例えば配列番号2に記載したアミノ酸配列をコードするものが挙げられる。しかしながら、複数個のアミノ酸の付加、欠失または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質も、もとのタンパク質と同等の酵素活性を維持することが知られている。従って本発明は、4’CGT活性を保持しているタンパク質である限り、配列番号２に記載のアミノ酸配列に対して１個または複数個のアミノ酸配列の付加、欠失および／または他のアミノ酸との置換によって修飾されたアミノ酸配列を有するタンパク質および当該タンパク質をコードする遺伝子も本発明に属する。なお、複数個とは、２～30個、好ましくは２～９個をいう。
【００３１】
本発明はまた、配列番号１に記載の塩基配列を有するDNAに対し、5xSSC、50℃といった比較的温和な条件下でハイブリダイズし、かつ4’CGT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子に関するものである。さらに、配列番号１に記載の塩基配列を有するDNAに対しストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ4’CGT活性を有するタンパク質をコードする遺伝子も、本発明の技術的範囲に属する。ここでいうストリンジェントな条件とは、例えば２ｘSSC、65℃があるが、ハイブリダイゼーションの条件はプローブに用いるDNAの長さ及び塩基組成によって異なるから、この条件に限定されない。
【００３２】
上述ようなハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子としては、天然由来のもの、例えば植物由来のもの、好ましくはゴマノハグ科由来のもの、さらに好ましくはキンギョソウ、リナリア、ウンラン由来の遺伝子が挙げられるが、植物由来に限定されるものではない。すなわち、本発明の4’CGT遺伝子は、キンギョソウ、リナリア、ウンラン由来の4’CGT遺伝子に限定されるものではなく、カルコン類4’位配糖体を含む他の生物種に由来する4’CGT遺伝子であれば、いずれでも黄色の花を育種するのに用いることができる。
また、ハイブリダイゼーションによって選択される遺伝子はcDNAであってもよく、ゲノムDNAであってもよい。
【００３３】

GTの保存領域の相同性を有する遺伝子は実施例に示すように、例えばキンギョソウやリナリア花弁から作製したcDNAライブラリーのスクリーニングによって得られる。また、配列番号２に記載のアミノ酸配列が改変されたアミノ酸配列を有するGTをコードするDNAは、配列番号１に記載の塩基配列を有するDNAを用いて、公知の部位特定変異誘発法やPCR法を用いて合成することができる。例えばアミノ酸配列を改変したいDNA断片をcDNAまたはゲノムDNAの制限酵素処理によって得、これを鋳型にして、所望のアミノ酸配列の改変に対応したプライマーを用い、部位特異的変異誘発またはPCR法を実施し、所望のアミノ酸配列の改変に対応したDNA断片を得ることができる。その後、この改変を導入したDNA断片を目的とする酵素の他の部分をコードするDNA断片と連結すればよい。

【００３４】

あるいはまた、短縮されたアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするDNAを得るには、例えば目的とするアミノ酸配列より長いアミノ酸配列、例えば全長アミノ酸配列をコードするDNAを所望の制限酵素により切断し、その結果得られたDNA断片が目的とするアミノ酸配列の全体をコードしていない場合は、不足部分のアミノ酸配列に対応するDNA断片を合成し、連結すればよい。

【００３５】

このようにして得られたGT遺伝子を大腸菌又は酵母での遺伝子発現系を用いて発現させ、当該大腸菌又は酵母の抽出液中の4’CGTの活性を測定することにより、得られたGT遺伝子が4’CGTを示すタンパク質をコードすることを確認することができる。4’CGTの活性は、例えば実施例3に記載したように、逆相樹脂に4’CGTの基質となるカルコン類を吸着させ後、当該逆相樹脂をGT遺伝子で形質転換した大腸菌又は酵母の抽出液と反応させ、生成したカルコン4’配糖体を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析することにより測定できる。

【００３６】

さらに、得られた4’CGT遺伝子を適切な宿主細胞で発現させることにより、当該遺伝子の産物である4’CGTタンパク質を得ることができる。あるいはまた、配列番号２に記載のアミノ酸配列の全部又は一部を有するタンパク質又はペプチドに対する抗体を用いて他の生物の4’CGT遺伝子を発現クローニングによって得ることもできる。

【００３７】

本発明はまた、4’CGT遺伝子を含む組換えベクター、特に発現ベクター、及び当該ベクターによって形質転換された宿主細胞に関するものである。宿主としては、原核生物または真核生物を用いることができる。原核生物としては細菌、例えばエシェリヒア（Escherichia）属に属する細菌、例えば大腸菌（Escherichia coli）、バシルス（Bacillus）属微生物、例えばバシルス.スブシルス（Bacillus subtilis）など従来公知の宿主細胞を用いることができる。

【００３８】

真核細胞としては、例えば真核微生物、好ましくは酵母または糸状菌が使用できる。酵母としては例えばサッカロミセス.セレビシエ(Saccharomyces cerevisiae)等のサッカロミセス（Saccharomyces）属酵母が挙げられ、また糸状菌としては、例えばアスペルギルス.オリゼ（Aspergillus oryzae）、アスペルギルス.ニガー（Aspergillus niger）等のアスペルギルス（Aspergillus）属微生物、及びペニシリウム（Penicillium）属微生物等が挙げられる。さらに動物細胞または植物細胞も宿主細胞として使用でき、動物細胞としては、マウス、ハムスター、サル、ヒト等の細胞系が使用される。さらに昆虫細胞、例えばカイコ細胞、またはカイコの成虫それ自体も宿主として使用される。

【００３９】

本発明の発現ベクターはそれらを導入すべき宿主の生物種に依存したプロモーターおよびターミネーター等の発現制御領域、及び複製起点等を含有する。細菌用、特に大腸菌における発現ベクターのプロモーターとしては、従来公知のプロモーター、例えばtrcプロモーター、tacプロモーター、lacプロモーター等が使用できる。また、酵母用プロモーターとしては、例えばグリセルアルデヒド３リン酸デヒドロゲナーゼプロモーター、PH05プ

ロモーター等が使用され、糸状菌用プロモーターとしては例えばアミラーゼ、trpC等のプロモーターが使用できるが、これらのプロモーターに限定されるものではない。また動物細胞用プロモーターとしてはウイルス性プロモーター、例えばSV40アーリープロモーター、SV40レートプロモーター等が使用される。発現ベクターの作製は制限酵素、リガーゼ等を用いて常法に従って行うことができる。また、発現ベクターによる宿主細胞の形質転換も従来公知の方法に従って行うことができる。

【００４０】

植物の発現ベクターの構築は、例えばアグロバクテリウムを用いる場合にはpBI121などのバイナリーベクターを、パーティクルガンを用いる場合にはpUC19などの大腸菌ベクターを用いることができる。さらに、当該植物の発現ベクターで形質転換された植物細胞を例えば抗生物質耐性遺伝子などのマーカー遺伝子を用いて選抜し、適切な植物ホルモン等の条件を用いて再分化させ、4’CGT遺伝子で形質転換された植物体を得ることができる。当該形質転換植物を栽培することにより、開花させ、花色が改変された植物体を得ることができる。

【００４１】

発現ベクターによって形質転換された宿主細胞又は形質転換植物体を培養又は栽培し、培養物等から常法に従って、例えば、濾過、遠心分離、細胞の破砕、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー等により目的とする4’CGTタンパク質を回収、精製することができる。

【００４２】

本発明はキンギョソウやリナリアの4’CGT遺伝子のみに限定されるものではなく、4’CGTの起源としては、植物でも動物でも微生物であってもよく、4’CGT活性を有していれば同様に花色改変へ利用できる。本発明はまた、4’CGT遺伝子の利用に関するものであり、4’CGT遺伝子を植物体に導入・発現することにより、花色が改変された植物体もしくはその子孫の植物体又はこれら植物体の組織も本発明の技術的範囲であり、組織の形態としては切り花であってもよい。また4’CGT遺伝子のみでなく、4’CGTに加えAS遺伝子も共に植物体へ導入、発現させたり、さらに加えて、宿主が本来有するフラボノイド合成系遺伝子の発現を抑制することによって花色が改変された植物体もしくはその子孫の植物体またはこれら植物体の組織も本発明の技術範囲であり組織の形態としては切花であってもよい。

【００４３】

現在の技術水準をもってすれば、植物に遺伝子を導入し、その遺伝子を構成的あるいは組織特異的に発現させることは可能であるし、またアンチセンス法、コサプレッション法、RNA法などによって目的の遺伝子の発現を抑制することも可能である。形質転換可能な植物の例としては、バラ、キク、カーネーション、金魚草、シクラメン、ラン、トルコギキョウ、フリージア、ガーベラ、グラジオラス、カスミソウ、カランコエ、ユリ、ペラルゴニウム、ゼラニウム、ペチュニア、トレニア、チューリップ、イネ、レンギョウ、ベゴニア、オオムギ、小麦、ナタネ、ポテト、トマト、ポプラ、バナナ、ユーカリ、サツマイモ、タイズ、アルファルファ、ルーピン、トウモロコシ、カリフラワーなどがあげられるがこれらに限定されるものではない。

【実施例】

【００４４】

以下実施例に従って、発明の詳細を述べる。分子生物学的手法はとくに断らない限り、WO96/25500あるいはMolecular Cloning(Sambrook et.al. Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989)に記載されている方法に従った。

実施例１．黄色キンギョソウ花弁cDNA ライブラリーの構築

黄色のキンギョソウである品種バタフライイエローの新鮮な花弁5ｇから論文(Science 290, 1163 (2000))に記載のようにしてcDNAライブラリーを構築した。得られたライブラリーは、1.6 x 10^5 plaque forming unitからなっていた。

【００４５】

実施例２．4’CGT遺伝子のスクリーニング１

すでに開示されているGTのアミノ酸配列を比較し、これらのアミノ酸配列の保存領域に相当する塩基配列を増幅し、これをプローブとして実施例１で述べたキンギョソウcDNAライブラリーをスクリーニングした。

プローブに用いたGTはアサガオ由来のUDP-グルコース：アントシアニジン3－グルコシド糖転移酵素（3GGT）（特開2003-289884）、ペチュニア由来3GT（Plant Mol. Biol. 48, 401、(2002)）、バーベナ由来5GT（J. Biol. Chem. 274, 7405 (1999))、コガネバナGT(SBGT、Planta 210,1006 (2000))、リンドウ由来のUDP-グルコース：アントシアニン3’－糖転移酵素（3’ GT）(Plant Physiol. 132,1652, (2003))配列の5種である。それぞれGTについて、保存された領域の配列を増幅できるように1組のオリゴヌクレオチドを合成した。これらオリゴヌクレオチドの配列を配列番号：3～12に示す。

【００４６】

アサガオ3GGT

配列番号３ ：5’-GAA ATG GTC GGA TTG GCT GGG-3’

配列番号４ ：5’-ACC TCC ACC CCA ACT TTC AGG-3’

ペチュニア3GT

配列番号５ ：5’-GAT GCA TAA TTT GGC TAG AAA AGC-3’

配列番号６ ：5’-CCA ATT TGC CAA ACA CTT TCC-3’

【００４７】

バーベナ5GT

配列番号７ ：5’-TGC CTC GAA TGG TTG AGC ACG-3’

配列番号８ ：5’-CTC TCA CTC TCA CAC CCG-3’

コガネバナGT

配列番号９ ：5’-CAC GAA TGC TTA GCA TGG CTC-3’

配列番号10 ：5’-CTT ATT GCC CAC TGA AAC CCC-3’

リンドウ3’ GT

配列番号11 ：5’-TGT CTG AAT TGG CTT GAT TCC-3’

配列番号12 ：5’-AAC CCA CAG AAA CCC CTG TTC-3’

【００４８】

プローブはノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システム（ロシュ・ダイアグノスティックス）を用いて、製造者が推奨する条件に従いPCRによりラベルした。この際、鋳型として１ngのそれぞれのｃDNAを含むプラスミドを用い、プライマーとして、上記の各遺伝子特異的なオリゴヌクレオチド100ngを使用し、95℃1分、55℃1分、72℃２分からなる反応を1サイクルとし、これを25サイクル行った。各遺伝子のPCR増幅産物を等量混合したものをハイブリダイゼーションのプローブとして、実施例１に記載のキンギョソウ由来のｃDNAライブラリーをスクリーニングした。

【００４９】

ハイブリダイゼーションは、30％ホルムアミド、１％SDSを含む5XSSC中、37℃で一晩行い、フィルターの洗浄は5x SSC, 1%SDSを用いて55℃で30分間行った。スクリーニングによるポジティブシグナルの検出はノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システム（ロシュ・ダイアグノスティックス）を用い、製造者の推奨する方法に従った。約30万プラークをスクリーニングし、最終的に10種類の完全長糖酵素転移酵素遺伝子を含むクローンを得た(pSPB264,1621,1620,1622,1610,1609,1617,1615,660,658)。DNA Sequencer model 3100（Applied Biosystems）を用い、合成オリゴヌクレオチドプライマーによるプライマーウォーキング法によってこれらのcDNA配列を決定した。これらcDNAのアミノ酸コード領域の塩基配列を配列番号14～23に示した。

【００５０】

実施例３．大腸菌を用いたカルコンGT活性の測定

3-1　大腸菌発現ベクターの構築と大腸菌におけるGTの発現

実施例2で得られた10種類のｃDNAにコードされるGT活性を大腸菌発現系を用いて解析した。まず、各cDNAの大腸菌発現コンストラクトを作製した。PCR法によって各ｃDNAの暫定

的開始メチオニンコドンに重なる様にNcoIサイトを導入し、開始メチオニンから終止コドンに至る領域を大腸菌発現ベクターpQE61(QIAGEN)の NcoIおよびKpnI、またはNcoIおよびEcoRVサイトに連結した。

【００５１】

開始メチオニンに重なるNcoIサイト導入のためのPCR反応液（25μｌ）は、各GTｃDNAを鋳型とし、開始メチオニン部位に重なるNcoI認識配列を導入したプライマー、及びストップコドン付近の下流から上流に向けてのプライマー各0.2 pmol/μｌ，1x ExTaq buffer（Takara)，0.2mM dNTPs,，ExTaq polymerase 1.25 Uからなる 。反応は、94℃で5分反応させた後、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分の反応を28サイクル行い、最後に72℃で5分間処理した。得られたPCR産物をpCR2.1 TOPO vector（INVITROGEN)に製造者が推奨する方法でサブクローニングした。増幅されたDNA断片のDNA配列を解析し、PCR反応によるエラーがないことを確認したのち、大腸菌発現ベクターｐQE61(QIAGEN)に導入した。

【００５２】

例えばｐSPB1617にコードされるcDNA（配列番号：20）については、配列表に示した1617BamHINcoI-FW（配列番号：24）ならびに1617XhoIKpnI-RV（配列番号：25）の二種のプライマーを用いてPCRを行い、開始メチオニン部位に重なるNcoIサイトと、終始コドン後にKpnIサイトを導入した。増幅されたDNA断片をpCR2.1 TOPO vectorにサブクローニングした。塩基配列にPCRによるエラーがないことを確認後、NcoIとKpnIで切り出したDNA断片をｐQEのNcoIおよびKpnIサイトに連結し、ｐSPB1617cDNAの大腸菌発現ベクターであるpSPB1642を得た。同様にして10種類のGT cDNAの大腸菌発現ベクターを構築した。

【００５３】

1617BamHINcoI-FW

配列番号24: 5’-ggg gga tcc atg gct agt gag agc caa ata-3’

1617XhoIKpnI-RW

配列番号25: 5’-ccc ctc gag ggt acc tca caa aac att att cac gac-3’

各発現ベクターを大腸菌株 JM109（TOYOBO)に導入し、37℃で終濃度20ug/mlのアンピシリンを含むＬB培地で一晩前培養した。前培養液の１mlをアンピシリン50μg/ml，カザミノ酸0.5%を含むM9培地、50mlに加えA600＝0.6-1.0に達するまで培養した後、IPTG（Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside）を終濃度0.1mMになるよう加え、さらに27℃で一晩振とう培養し、3000rpm,10分間、4で遠心し、集菌した。菌体を10mlの緩衝液（30mM Tris-HCl pH7.5、30mM NaCl）に懸濁し、SONIFIER 250（BRANSON社）での超音波処理により大腸菌を破砕した後、15,000rpm，10分、4℃で遠心分離を行い、得られた上清を粗酵素液とし、以下の活性測定に用いた。

【００５４】

3-2　酵素活性の測定

蒸溜水で平衡化済みの逆相樹脂、TOYOPEARL HW-40F(TOSOH) 1mlにTHC（500μg/mlエタノール溶液）を蒸溜水で希釈しながら負荷した後、水洗することにより、樹脂に固定された基質THCを得た。この樹脂固定されたTHC　100μｌに3-1で得られた粗酵素液200μｌおよび5mM UDP-glucose 10μｌを加え、30℃で1時間反応させた。遠心して上清を除去後、沈殿した樹脂を水洗し、0.1% TFA（Trifluoroacetic acid)を含む50%アセトニトリル300μｌに懸濁し、超音波処理によりフラボノイドを樹脂より遊離した。15,000 rpm、5分、4℃で遠心分離し、得られた上清をフィルター（ポアサイズ0.45mm、４mm Millex-LH、ミリポア）を用いて不溶物を除去して、上清を液体高速クロマトグラフィー(以下HPLC)で分析した。カルコンおよびその配糖体の分析条件は以下の通りである。

【００５５】

カラムはDevelosil C-30-UG-5(4.5mmφx150mm、野村化学)を用いて、移動相にはA液として0.1%TFAを含むH_2O、B液として0.1%TFAを含む90%アセトニトリルを用い、B液20%からB液70%の直線濃度勾配10分間の溶出後、B液70%で5分間維持した。流速は0.6ml/min.、検出は360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M6A（島津製作所）による250-400nmの吸収スペクトルにより行った。この条件で、THCは保持時間10.7分に溶出され、その2’配

糖体および4’配糖体は8.5分に溶出されることをTHC及びTHCの2’および4’配糖体の標品を用いて確認した。

【００５６】

pSPB1642を発現する大腸菌の抽出液を反応させたところ、基質THCに加え、8.5分に溶出される新たな生成物が検出された。これらはpQE61 ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液およびpSPB1642を発現する大腸菌の粗酵素液を煮沸した溶液を反応させたものでは検出されなかったことからpSPB1642から発現されるGTによって生じた生成物と考えられる。さらに^{1}H NMR分析によって本生成物の構造を調べた。分析にはJNM－EX400（JEOL）を用い、その他の分析条件は論文（PlantPhysiology132、1652(2003)）に記載のとおりである。この結果、pSPB1642の発現産物によって生じたTHC配糖化物はTHC 2’配糖体であることが明らかとなった。よって、ｐSPB1642によって発現されるｃDNA、つまりpSPB1617ｃDNAは2’CGT活性を有するタンパク質をコードしていると考えられた。

【００５７】

実施例４．4’CGT遺伝子のスクリーニング２

黄色キンギョソウ花弁のｃDNAライブラリー約30万クローンをｐSPB1617ｃDNA全長をプローブとして再度スクリーニングした。PCRによるプローブラベリングには、1617-F（配列番号：２６）ならびに1617-R（配列番号：２７）プライマ-を用い、実施例２記載の方法と同様に行った。スクリーニングと塩基配列の解析方法も実施例２と同様である。

【００５８】

1617-F

配列番号26 ： 5’-ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA ACA-3’

1617-R

配列番号27 ： 5’-TAA AAT TTG GTA GTT AAA CCG ATG TA-3’

その結果、新規GT遺伝子を5種、pSPB1721、1724、1723、1719、1725を得た。それぞれの配列を配列表に示した（配列番号：28～31及び１）。

【００５９】

このうちｐSPB1725ｃDNAは、457アミノ酸からなる分子量50.8kDa、pI6.82のタンパク質をコードする1374bp（ストップコドンを除く）のORFを含んでいた。ｐSPB1725ｃDNAがコードするアミノ酸配列（配列番号：２）を、すでに報告のあるGTのアミノ酸配列と比較したところリビングストーンデージー由来ＧＴ（Plant J. 19、509（1999））と14%、シソ由来5ＧＴと18%、シソ由来3ＧＴと18%、リンドウの3’GTと23%、プローブとして用いたｐSPB1617にコードされるタンパク質のアミノ酸配列とは31%の同一性しか示さなかった。なお、ホモロジー解析に使用したソフトフェアはMacVector ver.6.5.3 (Oxford Molecule)に含まれるClustalWで、条件は、Matrix Blosum 30、ketuple:1、Gap penalty:3、Topdiagonals :5、Windows Size:5で行った。

【００６０】

実施例５．得られたcDNAの大腸菌における発現

5-1.発現ベクターの構築

実施例４で得られた5種類のcDNAについて、大腸菌発現系を用い各ｃDNAにコードされるタンパク質の酵素活性の測定を調べた。発現ベクターの構築ならびに発現方法、活性測定方法は実施例３と同様である。例えばｐSPB1725については、開始コドンの5’側にNcoI認識配列を導入するために、以下に示すプライマー2種1725-NcoI（配列番号：３２）、1725-KpnI （配列番号：３３）を用いてPCR反応を行った。

【００６１】

1725-NcoI

配列番号32 ： 5’-CCC ATG GGA GAA GAA TAC AAG AAA-3’

1725-KpnI

配列番号33 ： 5’-GGT ACC TAT AAA ATT TGG TAG TTA AA-3’

PCR反応液（25μｌ）は、ｐSP1725 DNA 10ng, 1x ExTaq buffer (Takara), 0.2mM dNTPs, 1725-NcoI、1725-KpnIプライマー各0.2 pmol/μl, ExTaq polymerase 1.25 Uからなる

。

【００６２】

反応は、94℃で5分反応させた後、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分の反応を28サイクル行い、最後に72℃で7分間処理した。得られたPCR産物をpCR2.1 TOPO vector (INVITROGEN)に製造者が推奨する方法でサブクローニングした。増幅産物の塩基配列を確認したのち、NcoIおよびKpnI処理によってpCR2.1 TOPO vectorから切り出される約1.4Kbのフラグメントを pQE61 (QIAGEN) のNcoIとKpnIサイトに連結し、大腸菌発現ベクター p SPB1768を得た。これを大腸菌 JM109 株(TOYOBO)に導入した。他の4種類の c DNAについても同様にしてそれぞれpQE61を用いた大腸菌発現ベクターを構築し、JM109に導入した。

【００６３】

5-2組換えタンパク質の大腸菌における発現と活性測定GT活性の測定

実施例5-1で得られた大腸菌形質転換株を、実施例3と同様の条件で培養し、それぞれのcDNAにコードされるタンパク質の活性測定を行った。その結果、 p SPB1768を含む大腸菌の粗酵素液とTHCの反応物中に、THC配糖化物と思われるピークを検出した。このTHC配糖化物をさらに詳しく同定するために、以下に記載のTHC2’配糖体とTHC4’配糖体を分離する条件にて再度HPLC分析を行った。

【００６４】

カラムはYMC-ODS-A312(6mm ϕ x150mm、株式会社ワイエムシー)を用いて、移動相にはA液として2%酢酸を含むH_2O,B液としてメタノールを用い、B液15%からB液40%の直線濃度勾配15分間の溶出後、B液40%で5分間維持し、さらにB液40%からB液62%の直線濃度勾配10分間の溶出の後、B液62%で2分間維持した。流速は1.0 ml/min.で行った。検出は360 nmにおける吸光度、及びPDA検出器SPD-M6A (島津製作所) による250-400nmの吸収スペクトルにより行った。

【００６５】

この条件で、THCは保持時間26.7分に溶出され、THC2’配糖体は19.8分、THC 4’配糖体は20.6分に溶出される。 pSPB1768を発現する大腸菌抽出液とTHCの反応液中に見出されたTHC配糖化物は本条件による分析で20.6分に溶出されたのでTHC 4’配糖体であると考えられた。これはpQE61 ベクターのみを発現させた大腸菌から同様に調製した粗抽出液を反応させたものでは検出されなかったことからｐSPB1725にコードされるGTによって生じた産物と考えられる。以上の結果から、 p SPB1725 c DNAにコードされるGTはTHCの4’位の水酸基にグルコースを糖転移する活性を有することが確認された。

【００６６】

また、本反応液中にはTHC4’配糖体に加えて15.5分に溶出される新たなピークが検出された。この物質はナリンゲニンの吸収スペクトルを示し、ナリンゲニン７位配糖体標品と保持時間が一致した。よってこの15.5分に溶出された生成物はpSPB1725にコードされる4’CGTによって生成したTHC 4‘配糖化物が、配糖化後に閉環して生じたナリンゲニン7位配糖体あるいはTHCが閉環して生じたナリンゲニンに、4’CGTが作用して生じたナリンゲニン7位配糖体と考えられる。

【００６７】

実施例６．キンギョソウ花弁における4’CGT遺伝子の発現解析

RT-PCR法によってpSPB1725にコードされる4’CGT遺伝子の黄色キンギョソウ花弁における発現様式を解析した。オーロンを蓄積する黄色キンギョソウ (バタフライイエロー品種) の花弁を成長段階に沿って5ステージに分離した。若い順に、ステージ1(蕾花弁長1cm以下),2 (蕾か弁長1.0－1.5cm) ,3(蕾花弁長1.5－2.0cm),4(花弁長2.0－2.5cm、開花直前) および5(花弁長2.5cm以上、開花後の花弁)の5段階とし、ステージ5は成熟した花弁に対応する。

【００６８】

分離した花弁から1ｇからRNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてRNAを抽出した。得られたRNA 1μgを鋳型として逆転写反応を行い、cDNAを得た。 c DNA合成にはSuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR(GIBCO BRL)を利用し、合成条件は本シス

テム製造業者が推奨する条件に従った。得られたステージ別のｃDNAを鋳型に、実施例5に記載の1725-Ncol（配列番号：32）および1725-Kpnlプライマー（配列番号：33）を用いてPCR反応を行った。また、4’CGT遺伝子発現量と内在遺伝子発現量とを比較するために、内部標準遺伝子としてキンギョソウのグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子（配列番号：34）を用い（Nature 339, 46 (1989)）、本遺伝子増幅のためにAmGAPDH-F（配列番号：35）、AmGAPDH-R（配列番号：36）のプライマーを合成した。また、比較対象遺伝子としてキンギョソウのAS遺伝子増幅のためにAmAS-F（配列番号：37）、AmAS-Rプライマー（配列番号：38）を合成した。

【００６９】

AmGAPDH-F

配列番号35:　5’-tgt tgc tgt taa cga tcc at-3’

AmGAPDH-R

配列番号36：　5’-agc tct tcc acc tct cca-3’

AmAS-F

配列番号37：5’-atg ttc aaa aat cct aat atc cgc-3’

AmAS-R

配列番号38：5’-tta gcc atc aag ctc aat ctt gac a-3’

【００７０】

PCR反応条件は実施例3と同様の反応組成で、94℃、1分、55℃、1分、72℃、2分を12サイクル行った。PCR産物を1％アガロースゲル電気泳動で分離した後、常法によってHybond-Nナイロンメンブレン(アマシャム)にブロッティングし、ハイブリダイゼーションによる増幅産物の検出を行った。ハイブリダイゼーション方法については前述のノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システムDIG　DNA標識及び検出キットを用い、製造者の推奨する方法に従った。プローブには、キンギョソウのAS、GAPDHおよびpSPB1725にコードされる4’CGTのcDNAを用い、実施例2同様にして、上記の各遺伝子特異的プライマー（配列番号32, 33, 35～38）を用いてDIGラベリングを行った。

【００７１】

その結果、4’CGT遺伝子及びAS遺伝子はともにステージ4で発現がピークに達し、経時的に同様の発現パターンを示すことが分かった。さらに両遺伝子の発現パターンは黄色キンギョソウ花弁に含まれるカルコン4’配糖体およびオーロンの蓄積パターンに矛盾しないと考えられた（Plant Sci. 160, 229 (2001)）。

以上の結果からpSPB1725にコードされる4’CGT遺伝子は、キンギョソウ花弁内においてオーロン合成酵素遺伝子と同一の発現制御支配下に存在することが考えられ、両者は同一の生合成経路、すなわちオーロン生合成経路に関わっていると考えられる。

【００７２】

実施例７　植物における4’CGTとASの共発現

7-1　4’CGT発現カセットの構築

pBE2113-GUS (Plant Cell Physiol. 37, 45 (1996)) をSnaBIで消化し、再連結することによりomega配列を除き、得られたプラスミドをpUE6とした。一方、pUCAP (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995)をAscIで消化し、平滑末端化後、PacIリンカーを挿入したプラスミドをpUCPPとした。pUE6のEl$_2$35Sプロモーターから NOSターミネーターまでを有する断片を、pUCPPのHindIIIとEcoRIサイトに挿入しpSPB540を得た。pSPB540のGUS遺伝子部分をpSPB1725から切り出される4’CGT cDNA断片に置換し得られたプラスミドをpSFL203とした。すなわち、pSFL203はpUCPPをベクターとし、El$_2$35Sプロモーターと NOSターミネーターで制御される4’CGT発現カセットを有するものである。

【００７３】

7-2　AS発現カセットの構築

キンギョソウ由来のAS　cDNA　(Science 290, 1163, (2000)) がpBluescript II SK-ベクター(Stratagene)のEcoRIとXhoIサイトに挿入したプラスミドをpSPB251とした。pBINPLUS (van Engelen et al. Transgenic Research 4, 288-290, 1995)にMacIプロモータ

ー、pSPB251から切り出したAS　cDNA断片、MASターミネーターを連結したAS発現コンストラクトをpSPB1624とした。

【００７４】

7-3　4’CGTとASの共発現コンストラクトの作製

7-1に記載のpSFL203をPacIで切断し、カルコン配糖化酵素遺伝子発現カセットを切り出し、これを7-2記載のpSPB1624のPacIサイトに挿入した。得られたコンストラクトをpSFL201とした。よってpSFL201は植物細胞に導入された場合、4’CGT遺伝子とAS遺伝子が構成的に発現するように設計されている。

【００７５】

実施例8 植物における４’CGTとASの共発現ならびにトレニアのDFRの抑制

8-1トレニア由来のDFR遺伝子発現抑制カセットの構築

トレニアのジヒドロフラボノール還元酵素（DFR）cDNAについては論文(Plant Science 153, 33,2000)に記載のようにして取得した。トレニアDFR cDNAがベクターpBluescriptII SK－と連結したプラスミドをpTDF10とした。これを鋳型とし、ベクター配列に由来するM13リバースプライマー（配列番号39）とトレニアDFRｃDNA配列に塩基置換でNcoI認識部位を導入したプライマーThDFR-NcoI(配列番号40)を用いて、実施例3に記載のようにしてPCRを行った。得られた約0.75kbのフラグメントをpCR2.1-TOPO（インビトロジェン）にクローニングし、塩基配列を確認したのち、SacIとNcoIで0.75kbのトレニアDFR cDNA配列を切り出した。

【００７６】

またpTDF10をBamHIとNcoIで切断し、トレニアDFR　cDNAの5’末端から1.1kbを含むフラグメントを回収した。一方、7-1記載のpUCAPをPacIで消化し、平滑末端化後、AscIリンカーを挿入したプラスミドをpUCAAとした。このpUCAAのHindIIIとEcoRIサイトに、pUE6から切り出したE$l_2$35Sプロモーター～GUS～NOSターミネーターに至るフラグメントを挿入し、得られたプラスミドをpSPB541とした。pSPB541をBamHIとSacIで切断し、GUS遺伝子部分を除き、ここに、トレニアDFR cDNA由来の0.75kbのフラグメントとおよび1.1kbのフラグメントを、両フラグメントのNcoI部位が連結する方向に挿入した。このようにして得られたプラスミドpSFL314は、植物体内の導入された場合、E$l_2$35Sプロモーターの制御下、トレニアのDFR cDNA配列に由来する二本鎖RNAを転写し、RNAi法によってトレニアのDFR遺伝子発現を抑制することができるものである。

【００７７】

M13リバースプライマー

配列番号39：　5’-AACAGCTATGACCATG-3’

ThDFR-NcoI

配列番号40：5’-GCTTTACCATGGAGTAATGAGCTT-3’

【００７８】

8-2　4’CGTとASの共発現ならびにトレニアのDFRの抑制のためのコンストラクトの構築

7-1記載のpUE6のNOSターミネーター上流にXhoIリンカーを挿入した。このプラスミドをBamHIとXhoIで消化して得られるE$l_2$35Sプロモーター～ベクター～NOSターミネーターからなる断片と7-2記載のpSPB215からBamHIとXhoIで切り出したAS　cDNA断片を連結しpSPB211を得た。pSPB211からHindIIIとEcoRIでAS発現カセットを切り出し、これをpBINPLUSのHindIIIとEcoRIサイトに挿入した。このようにして得られたプラスミドのPacIサイトに、7-1記載のpSFL203をPacI切断して得られる4’CGT発現カセットを挿入し、4’CGTとASの発現カセットがタンデムに連結したpSFL304を得た。さらに8-1記載のトレニアDFR 二本鎖RNA転写カセットをpSFL304のAscIサイトに挿入し、pSFL307を得た。つまりpSFL307は4’CGTとASの発現ならびにトレニアのDFR抑制のための３つのカセットを有する。

【００７９】

実施例9 植物における4’CGTとASの共発現ならびにトレニアのF3Hの抑制

9-1トレニア由来のF3HｃDNAのクローニングと同遺伝子発現抑制カセットの構築

シソから得られたF3H cDNA (Plant Mol Biol., 35, 915 (1997)) をプローブとして、

トレニアの同酵素をコードするcDNAを取得した。すなわち、実施例２同様にして、トレニアcDNAライブラリー（Molecular Breeding, 6, 239, 2000）約20万のファージをスクリーニングした結果、配列番号41に示すトレニアF3H cDNAを得た。トレニアF3H c DNAがベクターpBluescriptII SK－と連結したプラスミドをpSPB266とした。これを鋳型とし、ベクター配列に由来するM13リバースプライマー（配列番号39）とトレニアF3H c DNA配列に塩基置換でSalI認識部位を挿入したプライマーThF3H-SalI-1(配列番号42)を用いて、実施例3同様にしてPCRを行った。

【００８０】

得られた約0.9kbのフラグメントをpCR2.1-TOPO（インビトロジェン）にクローニングし、塩基配列を確認した。同様にして、トレニアF3H cDNA配列に塩基置換でSalI認識部位を挿入したプライマーThF3H－SalI-2(配列番号43)とM13リバースプライマーを用いて、約0.75kbのDNA断片を調整し、pCR2.1-TOPOにクローニングし、塩基配列を確認した。実施例8-1に記載のpSPB541をBamHIとSacIで切断し、GUS遺伝子部分を除き、ここにpCR2.1-TOPOからBamHIとSalI切断で切り出した0.9kbのフラグメントと、pCR2.1-TOPOからSacIとSalI切断で切り出した0.7kbのフラグメントを両フラグメントのSalI部位が連結するように挿入した。このようにして得られたプラスミドpSFL313は、植物体内に導入された場合、$El_2$35Sプロモーターの制御下、トレニアのF3H cDNA配列に由来する二本鎖RNAを転写し、RNAi法によってトレニアのF3H遺伝子発現を抑制するものである。

【００８１】

ThF3H-SalI-1
配列番号42：　5’-ttctctgtcgacgcccattgcc-3’
ThF3H-SalI-2
配列番号43：　5’-cgccgtgtcgactcgcttgaag-3’

【００８２】

9-2　4’CGTとASの共発現ならびにトレニアのF3Hの抑制のためのコンストラクトの構築

9-1記載のpSFL313からAscI切断によりトレニアF3H RNAi抑制カセットを切り出し、実施例8-2記載のpSFL304のAscIサイトに挿入し、pSFL308を得た。つまりpSFL308は４’CGTとASの発現ならびにトレニアのF3H抑制のための３つのカセットを有する。

【００８３】

実施例10．植物における遺伝子発現と花色分析

実施例7-9で述べたｐSFL201、ｐSFL307およびｐSFL308を公知の方法でトレニア（品種サマーウェーブブルー（サントリーフラワーズ株式会社））に導入した。形質転換の方法はMol. Breeding. 6, 239, (2000)に記載の方法にしたがった。選択マーカー耐性を示した個体を選抜し、それぞれの花色を観察した。ｐSFL201導入株では、得られた35系統の形質転換体のうち、22系統において宿主と比べて花色変化が見られ、黄色味を帯びた青、もしくは黄色味を帯びたグレーを示した。

【００８４】

しかし、完全に黄色になったものはなかった。pSFL307導入株では得られた36系統の形質転換体のうち、19系統において宿主と比べて花色変化が見られた。さらに、花色が変化した19系統のうち6系統については宿主本来の青い色がほとんど混在せず、ほぼ完全な黄色花色を呈していた。またｐSFL308導入株では得られた39系統の形質転換体のうち、24系統において宿主と比べて花色変化が見られた。さらに、花色が変化した24系統のうち17系統については宿主本来の青い色がほとんど混在せず、ほぼ完全な黄色花色を呈していた。

【００８５】

花色変化が比較的顕著であったものについて色素分析を行った。

元株および各形質転換体の花弁を0.1％トリフルオロ酢酸（TFA）を含む50％アセト二トリルに浸潤し、フラボノイドを抽出後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によりオーレオシジン6位配糖化物およびアントシアニジンの分析を行った。アントシアニジン分析については花弁より抽出したフラボノイドを6NHClにて沸騰水中、20分間で加水分解後、アミルアルコールにてフラボノイドを再抽出したものを分析に供した。HPLC条件はそれぞ

れ以下のとおりである。

【００８６】

まずAU6位配糖化物の検出には、SHIM-PACK FC-ODSカラム(50×4.6mm、島津製作所)を用い、移動相にはA液として0.05%TFAを含むH_2O、B液として0.05%TFAを含むアセトニトリルを用いた。B液10%から23%の直線濃度勾配3分間の溶出後、B液23%で17分間維持し、さらにB液23%から80%の直線濃度勾配2分間の溶出後、B液80%で3分間維持した。さらにB液80%から10%の直線濃度勾配2分間で溶出した。流速は0.8ml/minで行った。検出は360、400nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP（島津製作所）による250-500nmの吸収スペクトルにより行った。本条件下で、THC　4'位配糖化物、AU　6位配糖化物標品はそれぞれ保持時間14.17分および6.19分に溶出される。

【００８７】

次にアントシアニジンはカラムはYMC-ODS-A　A312(6×150mm、株式会社ワイエムシー)を用いた。移動相には酢酸、メタノール、蒸溜水をそれぞれ60:70:270に混合したものを用い、11分間維持した。検出は520nmにおける吸光度、およびPDA検出器SPD-M10AVP（島津製作所）による400-600nmの吸収スペクトルにより行った。本条件下で、マルビジンは保持時間9.12分に溶出される。

【００８８】

その結果、ｐSFL201を導入した形質転換体ではTHC 4'位配糖化物ならびにAU 6位配糖化物と保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物が、それぞれ花弁中に0.02%および0.05%(花弁新鮮重量中のW／W)生成していることが確認された。また宿主が本来含有するアントシアニジン類も形質転換体に存在するため、これら形質転換体で観察された黄色がかった青またはグレーの花色は、THC４'位配糖化物ならびにAU 6位配糖化物と、マルビジンなどのアントシアニジン類が共存したためと考えられる。

【００８９】

一方、ｐSFL307および308を導入した形質転換体ではオーロンの一種であるAU6位配糖化物のみと保持時間および吸収スペクトルが一致する生成物が、ともに花弁中に0.09%（花弁新鮮重量中のW／W)生成していることが確認された。またpSFL201を導入した系統とは異なり、ｐSFL307またはｐSFL308が導入された系統では、宿主が本来有するアントシアニジン類が宿主花弁に含まれる当該アントシアニジンの10～50%と著しく減少していることが確認された。

【００９０】

実施例11．ゲノミックサザンハイブリダイゼーションによる4'CGT遺伝子導入の確認

実施例10で得られた形質転換体のうち、花弁の色素分析結果からTHC　4'位配糖化物ならびにAU 6位配糖化物の蓄積量が比較的多かった系統を、各コンストラクト導入株から3系統ずつ選抜し、ゲノミックハイブリダイゼーションをおこなった。形質転換体の葉、約1gからPhytopure Plant DNA Extraction kit(Amersham)を用い、製造業者推奨の方法によってゲノムDNAを抽出した。得られたゲノムDNA各20μgを制限酵素KpnIで切断し、0.7% アガロースゲル電気泳動にて分離後、常法にしたがってHybond-N^+ナイロンメンブレンに転写後、ノンラジオアイソトープDIG-核酸検出システムを用い、ハイブリダイゼーションを行った。

【００９１】

4'CGTプローブのDIGラベリング、ハイブリダイゼーションならびに検出方法は実施例6同様に製造業者推奨の方法に従った。ハイブリダイゼーションの結果を図2に示す。ｐSFL201、ｐSFL307、pSFL308の制限酵素地図を考慮するとゲノミックサザンで検出されたバンドの数から各形質転換体に導入された4'CGT遺伝子コピー数を推定することができる。

pSFL201導入系統については、いずれの系統でも1本のバンドが見られることから1コピーの導入遺伝子を有することが推定される。pSFL307導入系統については、系統番号２および４の個体は1コピー、系統番号13の個体では2本のバンドが見られることから2コピーの4'CGT cDNA が導入されたものと考えられる。pSFL308導入系統については、いずれの系統でも1本のバンドが見られることから1コピーの導入遺伝子を有することが推定される

。

【００９２】

実施例12　定量RT-PCRによる導入遺伝子の発現解析

RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて元株および形質転換体各系統のつぼみからtotal RNA を抽出し、得られたtotal RNA 1μgよりSuper Script™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen)を用いてcDNAを合成した。得られたcDNAのうち1μlをテンプレートとし、ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)にてトレニアDFR,F3Hおよび外来性遺伝子であるAS,4' CGTの転写産物の発現定量を行った。製造者が推奨するソフトウェア' Primer Express'にて、各遺伝子を特異的に増幅するようなオリゴプライマーおよび特異的にハイブリダイズするような両末端を蛍光ラベルしたTaq Man プローブを設計し反応に供した。また内在性コントロールとして、トレニアのグリセルアルデヒドリン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH)を用いた。

【００９３】

反応液は、元株または形質転換体各系統のcDNA , 1x Taq Man Universal Master Mix (Applied Biosystems),オリゴプライマー 各100nM, Taq Manプローブ 100nMからなる 総体積50μ l に調整した。反応条件は、50℃で2分、95℃、10分反応させた後、95℃、15秒、60℃、1分の反応を40サイクル行いPCRでの増幅産物の生成過程をリアルタイムで検出した。その結果、pSFL201導入系統では導入したAS, 4' CGTがともに高発現していることを確認した。pSFL307導入系統では導入したAS, 4' CGTがともに発現し、内在性のDFRmRNAが元株に比べて約10％程度にまで抑制されていることが確認された。また、pSFL308導入系統においては導入したAS, 4' CGTがともに発現し、内在性のF3HmRNAが元株に比べて約5％程度にまで抑制されていることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【００９４】

【図１】植物における典型的なフラボノイド合成経路を示す。ここに記載された酵素遺伝子の有無により植物種ごとに代謝経路の末節は異なる。たとえば、黄色のキンギョソウ花弁においてはアントシアニン合成経路と共にオーロン合成に至る経路も存在するが、同じゴマノハグサ科の植物であっても、トレニアでは4' CGT、AS遺伝子が存在しないため、オーロンを合成することは出来ない。図中の略称については以下参照。CHS, カルコン合成酵素; CHI, カルコン異性化酵素; F3H, フラバノン　3－水酸化酵素; DFR, ジヒドロフラボノール4-還元酵素; ANS, アントシアニジン合成酵素; 3GT, UDP-グルコース:アントシアニジン 3-糖転移酵素; FLSフラボノール合成酵素; FNS, フラボン合成酵素; F3' H, フラボノイド 3' -水酸化酵素; F3' , 5' H, フラボノイド 3' , 5' -水酸化酵素; 2' CGT, UDP-グルコース:4, 2' ,4' ,6' -テトラヒドロキシカルコン 2' -糖転移酵素; 4' CGT, UDP-グルコース: 4, 2' ,4' ,6' -テトラヒドロキシカルコン 4' -糖転移酵素; AS, オーレオシジン合成酵素

【図２】図２は、図１の続きである。

【図３】図３は、形質転換体トレニアのサザンハイブリダイゼーションの結果を示す。pSFL201、pSFL307、pSFL308導入の形質転換体トレニア(品種サマーウェーブブルー)葉よりゲノムDNAを抽出し、KpnI切断後、4' CGTをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションに供した。各レーンの上の数字は導入遺伝子コンストラクトおよび形質転換体系統番号を記す。SWBは宿主サマーウェーブブルーである。M1、M2はDIGラベルしたサイズマーカーであり、各バンドのサイズを図の左右に記す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110>Suntory Limited te al.
<120>Proess for production of yellow flowers by control of flavonoid synthesis system
<130>1034724
<160>43
<210>1
<211>1422
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>Nucleic acid in pSPB1725
<400>1

```
atg gga gaa gaa tac aag aaa aca cac aca ata gtc ttt cac act tca      48
Met Gly Glu Glu Tyr Lys Lys Thr His Thr Ile Val Phe His Thr Ser
  1               5                  10                  15
gaa gaa cac ctc aac tct tca ata gcc ctt gca aag ttc ata acc aaa      96
Glu Glu His Leu Asn Ser Ser Ile Ala Leu Ala Lys Phe Ile Thr Lys
             20                  25                  30
cac cac tct tca atc tcc atc act atc atc agc act gcc ccc gcc gaa     144
His His Ser Ser Ile Ser Ile Thr Ile Ile Ser Thr Ala Pro Ala Glu
         35                  40                  45
tct tct gaa gtg gcc aaa att att aat aat ccg tca ata act tac cgc     192
Ser Ser Glu Val Ala Lys Ile Ile Asn Asn Pro Ser Ile Thr Tyr Arg
     50                  55                  60
ggc ctc acc gcg gta gcg ctc cct gaa aat ctc acc agt aac att aat     240
Gly Leu Thr Ala Val Ala Leu Pro Glu Asn Leu Thr Ser Asn Ile Asn
 65                  70                  75                  80
aaa aac ccc gtc gaa ctt ttc ttc gaa atc cct cgt cta caa aac gcc     288
Lys Asn Pro Val Glu Leu Phe Phe Glu Ile Pro Arg Leu Gln Asn Ala
                 85                  90                  95
aac ctt cga gag gct tta cta gat att tcg cga aaa tcc gat atc aaa     336
Asn Leu Arg Glu Ala Leu Leu Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asp Ile Lys
            100                 105                 110
gca tta atc atc gat ttc ttc tgc aat gcg gca ttt gaa gta tcc acc     384
Ala Leu Ile Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe Glu Val Ser Thr
        115                 120                 125
agc atg aac ata ccc act tac ttc gac gtc agt ggc ggc gct ttt ctc     432
Ser Met Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Asp Val Ser Gly Gly Ala Phe Leu
    130                 135                 140
ctc tgc acg ttt ctc cac cac ccg aca cta cac caa act gtt cgt gga     480
Leu Cys Thr Phe Leu His His Pro Thr Leu His Gln Thr Val Arg Gly
145                 150                 155                 160
gac att gcg gat ttg aac gat tct gtt gag atg ccc ggg ttc cca ttg     528
Asp Ile Ala Asp Leu Asn Asp Ser Val Glu Met Pro Gly Phe Pro Leu
                165                 170                 175
att cac tcc tct gat tta cca atg agt ttg ttt tat cgt aag act aat     576
```

```
Ile His Ser Ser Asp Leu Pro Met Ser Leu Phe Tyr Arg Lys Thr Asn
            180                 185                 190
gtt tac aaa cac ttt cta gac act tcc tta aac atg cgc aaa tcg agt      624
Val Tyr Lys His Phe Leu Asp Thr Ser Leu Asn Met Arg Lys Ser Ser
        195                 200                 205
ggg ata ctc gtg aac acg ttt gtt gcg ctc gag ttt cga gct aag gaa      672
Gly Ile Leu Val Asn Thr Phe Val Ala Leu Glu Phe Arg Ala Lys Glu
    210                 215                 220
gct ttg tcc aac ggt ttg tac ggt cca act ccg cct ctt tat tta ctt      720
Ala Leu Ser Asn Gly Leu Tyr Gly Pro Thr Pro Pro Leu Tyr Leu Leu
225                 230                 235                 240
tca cat aca att gcc gaa ccc cac gac act aaa gtg ttg gta aac caa      768
Ser His Thr Ile Ala Glu Pro His Asp Thr Lys Val Leu Val Asn Gln
                245                 250                 255
cac gaa tgc cta tca tgg ctt gat ttg cag cct agt aaa agc gtg att      816
His Glu Cys Leu Ser Trp Leu Asp Leu Gln Pro Ser Lys Ser Val Ile
            260                 265                 270
ttc ctt tgt ttc gga aga aga gga gcg ttc tca gca caa cag ttg aaa      864
Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Ala Phe Ser Ala Gln Gln Leu Lys
        275                 280                 285
gaa att gcg ata ggg ttg gag aag agt gga tgt cga ttt ctt tgg ttg      912
Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Lys Ser Gly Cys Arg Phe Leu Trp Leu
    290                 295                 300
gcc cgc att tca ccg gag atg gac tta aat gcg ctt ctg ccg gag ggt      960
Ala Arg Ile Ser Pro Glu Met Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Glu Gly
305                 310                 315                 320
ttt cta tcg aga act aaa gga gta ggg ttt gtg aca aac aca tgg gtg     1008
Phe Leu Ser Arg Thr Lys Gly Val Gly Phe Val Thr Asn Thr Trp Val
                325                 330                 335
ccg caa aaa gag gtg ttg agt cat gat gca gtg ggg ggg ttt gtg act     1056
Pro Gln Lys Glu Val Leu Ser His Asp Ala Val Gly Gly Phe Val Thr
            340                 345                 350
cat tgc ggg tgg agt tcg gtt ctt gaa gcg ctg tcg ttc ggt gtc ccg     1104
His Cys Gly Trp Ser Ser Val Leu Glu Ala Leu Ser Phe Gly Val Pro
        355                 360                 365
atg att ggt tgg ccg ttg tac gca gag cag agg atc aat agg gtg ttc     1152
Met Ile Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Ile Asn Arg Val Phe
    370                 375                 380
atg gtg gag gaa ata aag gtg gcg ctg cca ttg gat gag gaa gat gga     1200
Met Val Glu Glu Ile Lys Val Ala Leu Pro Leu Asp Glu Glu Asp Gly
385                 390                 395                 400
ttt gtg acg gcg atg gag ttg gag aag cgc gtc agg gag ttg atg gag     1248
Phe Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu
                405                 410                 415
tcg gta aag ggg aaa gaa gtg aag cgc cgt gtg gcg gaa ttg aaa atc     1296
Ser Val Lys Gly Lys Glu Val Lys Arg Arg Val Ala Glu Leu Lys Ile
            420                 425                 430
tct aca aag gca gcc gtg agt aaa ggt gga tcg tcc ttg gct tct ttg     1344
Ser Thr Lys Ala Ala Val Ser Lys Gly Gly Ser Ser Leu Ala Ser Leu
        435                 440                 445
```

gag aag ttc atc aac tcg gtc act cgt taaag tttcttactc aatatatggt 1396
Glu Lys Phe Ile Asn Ser Val Thr Arg
450 455
acatcggttt aactaccaaa ttttat 1422

<210>2
<211>457
<212>PRT
<213>
<223>Amino acid sequence of 4,2',4',6'-tetrahydroxychalcane 4'-O-glycosyltransferase encoded in pSPB1725
<400>2

Met Gly Glu Glu Tyr Lys Lys Thr His Thr Ile Val Phe His Thr Ser
1 5 10 15
Glu Glu His Leu Asn Ser Ser Ile Ala Leu Ala Lys Phe Ile Thr Lys
20 25 30
His His Ser Ser Ile Ser Ile Thr Ile Ile Ser Thr Ala Pro Ala Glu
35 40 45
Ser Ser Glu Val Ala Lys Ile Ile Asn Asn Pro Ser Ile Thr Tyr Arg
50 55 60
Gly Leu Thr Ala Val Ala Leu Pro Glu Asn Leu Thr Ser Asn Ile Asn
65 70 75 80
Lys Asn Pro Val Glu Leu Phe Phe Glu Ile Pro Arg Leu Gln Asn Ala
85 90 95
Asn Leu Arg Glu Ala Leu Leu Asp Ile Ser Arg Lys Ser Asp Ile Lys
100 105 110
Ala Leu Ile Ile Asp Phe Phe Cys Asn Ala Ala Phe Glu Val Ser Thr
115 120 125
Ser Met Asn Ile Pro Thr Tyr Phe Asp Val Ser Gly Gly Ala Phe Leu
130 135 140
Leu Cys Thr Phe Leu His His Pro Thr Leu His Gln Thr Val Arg Gly
145 150 155 160
Asp Ile Ala Asp Leu Asn Asp Ser Val Glu Met Pro Gly Phe Pro Leu
165 170 175
Ile His Ser Ser Asp Leu Pro Met Ser Leu Phe Tyr Arg Lys Thr Asn
180 185 190
Val Tyr Lys His Phe Leu Asp Thr Ser Leu Asn Met Arg Lys Ser Ser
195 200 205
Gly Ile Leu Val Asn Thr Phe Val Ala Leu Glu Phe Arg Ala Lys Glu
210 215 220
Ala Leu Ser Asn Gly Leu Tyr Gly Pro Thr Pro Pro Leu Tyr Leu Leu
225 230 235 240
Ser His Thr Ile Ala Glu Pro His Asp Thr Lys Val Leu Val Asn Gln
245 250 255
His Glu Cys Leu Ser Trp Leu Asp Leu Gln Pro Ser Lys Ser Val Ile
260 265 270
Phe Leu Cys Phe Gly Arg Arg Gly Ala Phe Ser Ala Gln Gln Leu Lys
275 280 285
Glu Ile Ala Ile Gly Leu Glu Lys Ser Gly Cys Arg Phe Leu Trp Leu
290 295 300

Ala Arg Ile Ser Pro Glu Met Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Glu Gly
305 310 315 320
Phe Leu Ser Arg Thr Lys Gly Val Gly Phe Val Thr Asn Thr Trp Val
325 330 335
Pro Gln Lys Glu Val Leu Ser His Asp Ala Val Gly Gly Phe Val Thr
340 345 350
His Cys Gly Trp Ser Ser Val Leu Glu Ala Leu Ser Phe Gly Val Pro
355 360 365
Met Ile Gly Trp Pro Leu Tyr Ala Glu Gln Arg Ile Asn Arg Val Phe
370 375 380
Met Val Glu Glu Ile Lys Val Ala Leu Pro Leu Asp Glu Glu Asp Gly
385 390 395 400
Phe Val Thr Ala Met Glu Leu Glu Lys Arg Val Arg Glu Leu Met Glu
405 410 415
Ser Val Lys Gly Lys Glu Val Lys Arg Arg Val Ala Glu Leu Lys Ile
420 425 430
Ser Thr Lys Ala Ala Val Ser Lys Gly Gly Ser Ser Leu Ala Ser Leu
435 440 445
Glu Lys Phe Ile Asn Ser Val Thr Arg
450 455

<210>3
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Morning glories 3GGT
<400>3
gaaatggtcg gattggctgg g 21

<210>4
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Morning glories 3GGT
<400>4
acctccaccc caactttcag g 21

<210>5
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>

<223>Primer for cloning DNA encoding Petunia 3GT
<400>5
gatgcataat ttggctagaa aagc　24

<210>6
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Petunia 3GT
<400>6
ccaatttgcc aaacactttc c　21

<210>7
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Verbena 5GT
<400>7
tgcctcgaat ggttgagcac g　21

<210>8
<211>18
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Verbena 5GT
<400>8
ctctcactct cacacccg　18

<210>9
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Baicalein GT
<400>9
cacgaatgct tagcatggct c　21

<210>10
<211>21

<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Baicalein GT
<400>10
cttattgccc actgaaaccc c　21

<210>11
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Gentiana 3'GT
<400>11
tgtctgaatt ggcttgattc c　21

<210>12
<211>21
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer for cloning DNA encoding Gentiana 3'GT
<400>12
aacccacaga aacccctgtt c　21

<210>13
<211>1446
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB264
<400>13
atgggaaaac ttcacattgc cttatttcca gttatggctc atggtcacat gatcccaatg　60
ttggacatgg ccaagctctt tacctcaaga ggcatacaaa caacaatcat ttcgactctc　120
gccttcgctg atccgataaa caaagctcgt gattcgggcc tcgatattgg actaagcatc　180
ctcaaattcc caccagaagg atcaggaata ccagatcaca tggtgagcct tgatctagtt　240
actgaagatt ggctcccaaa gtttgttgag tcattagtct tattacaaga gccagttgag　300
aagcttatcg aagaactaaa gctcgactgt ctcgtttccg acatgttctt gccttggaca　360
gtcgattgtg cggctaagtt cggtattccg aggttggttt tccacggaac gagcaacttt　420
gcgttgtgtg cttcggagca aatgaagctt cacaagcctt ataagaatgt aacttctgat　480
actgagacat ttgttatacc ggatttcccg catgagctga agtttgtgag gactcaagtg　540
gctccgtttc agcttgcgga aacggagaat ggattctcaa agttgatgaa acagatgacg　600

gagtctgttg gtagaagcta cggtgttgtg gttaacagtt tttatgagct cgagtcgact 660
tatgtggatt attacagaga ggttttgggt agaaagtctt ggaatatagg gcctctgttg 720
ttatccaaca atggcaatga ggaaaaagta caaaggggaa aggaatctgc gattggcgaa 780
cacgaatgct tggcttggtt gaattccaag aagcagaatt cggttgttta cgtttgtttt 840
ggaagtatgg cgacttttac tccagcgcag ttgcgcgaaa ctgcgattgg actcgaggaa 900
tcaggccaag agttcatttg ggtagttaaa aaggccaaaa acgaagaaga aggaaaagga 960
aaagaagaat ggctgccaga aaattttgag gaaagagtga aagatagagg cttgatcata 1020
agaggatggg cgccgcaatt gttgatactc gatcatcctg cggtaggagc tttcgtgacg 1080
cattgtggat ggaattcgac gttggaagga atatgcgccg gtgtgcctat ggtgacttgg 1140
ccagttttcg cagagcagtt tttcaatgag aagtttgtga cagaggtttt ggggaccggt 1200
gtttcggttg ggaataagaa gtggctaagg gcagcaagtg aaggtgtgtc gagggaggca 1260
gtgacgaacg cggtgcagcg tgttatggtg ggagaaaatg cgtcggagat gagaaagcga 1320
gcgaagtatt ataaggaaat ggcgaggcgg gcggttgagg aaggcggttc gtcttataat 1380
ggtttgaatg agatgataga ggatttgagt gtgtaccgtg ctccagaaaa acaagactta 1440
aactag 1446

<210>14
<211>1488
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB662
<400>14
atggcctttc aaattcaacc agagcttcta aacttcgttt tcataccatt catggcccct 60
ggccactcaa tccctatgat agacttagcc aaattattcg cggaacgcgg cgtcaacgta 120
acgatcatcg taacacctct taacgccgca cgattcaatt ccgttattaa tcgagccgtt 180
gaatcaggac agtccattcg tcttctccaa gtaaaattcc ctggtgaaga agccgggttg 240
ccacctggat gcgaaagcgc cgagacttta ccatcttatg aattgattcc aaatttttt 300
accgccgtaa aaatgttaca acaaccaatc gaggaagaat tgagaaattt gatcccttta 360
ccaagctgcg tcatttgtga taaacacata ccctggactg ctcaaacgtg caagaatctc 420
cgaattccga ggataatttt cgatggaatg agctgttttg ctcctttagt aacacacgtt 480
ctctacgtgt ctaaggttca tgaaaccgtt cctccaaacg agccgttcgt tgttcctgat 540
ttccccgatg agatagagtt aacgaggttt caattgccag ggttgttgaa tccaagtcca 600
aggataaatt tttacgattt tcgcgaacaa gtgaagaaaa ctgaggagga ggcttatggg 660
gtggtggtga acagttttga ggagctggaa aaagattatt tcgagatgtt tcggaaattg 720
aaaggggta aagtttggtg tgttgggcct ttgtcgcttt atggtaacga cgatttggac 780
agggctggaa gagggaataa ggcgtcgatt gatacggatc ggtgtatgaa atggcttgat 840
gatatgaaac cagaatctgt aatttatgcc tgtttgggaa gcctgagtcg tttgtcgcgt 900
tcacagttcg tcgaacttgc tttgggattg gaagcatcaa aacactcgtt tgttctagtt 960
gttaaaaccg aaggagagaa gtcgttggaa atagagaaat ggattttgga caatggattc 1020
gaggaaagaa cgaaagatag agggttcttg attcgtggtt ggtcgccaca agtgttgatc 1080
ttgtcgcatt ttgcagtggg aggattcttg acgcattgtg gttggaattc gacgcttgag 1140
ggcatttgtg ctggtttgcc aatggtgatg tggccgatgt tcggcgaaca gtttttgaat 1200
gagaagttag tggtgcagat tttggggacg ggtgtgggag ttggagcgaa aagtacggta 1260
catttggggg atgaagagat ggatgagatg agagtgacga ggaaggggat taccaaggcg 1320
gtcgtggcag ttatggatag aggaactgaa gggtgtgaga ggcggagaaa ggcgaaggag 1380
cttggtgaaa tggctaagag ggcagtccaa gttgggggat cttcatgtaa gaatgtcgac 1440
cagctaattc aagaagttgc accattgagt gtagcgaggg atgtgtaa 1488

<210>15
<211>1446
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1621
<400>15
atgggttctc tccctgaaaa tgagctcaac aaaccacatg ctgtgtgcat accctatcca 60
gcactagggc atttcagtcc catgctagat tttgctaagc tcctccacca aaaaggcttt 120
cacataacct tcgtcaacac cgagtacatc cgtctccgcc tcctcaagtc ctgtggccct 180
gccgccctgg acgggctacc ggactttcgc ttcatgacta tccccgatgg cctccctttg 240
tcggacgacg tttcgcgtga tgtcgcttcc atttctgtct ctactaacaa aacttgctta 300
gaaccctttt gtgaggtgct atcggacctc atggataatg gttccaaccc gccggtgagc 360
tgcattgtgt ccgacggggt aatgagtttc acccttgagg cggcggagag gtttggactg 420
ccagaggtgc tgttctggac gcccgctgct tgtggcatct tagctttcac gcagtataag 480
catcttgtgg agagaggata tgtacctctc aaagatacga gccaggtaac aaatggctac 540
ctggaaacaa tattagattg ggttccaggg atgaaggata ttcgattgag ggaattccca 600
actttcataa gaacgacgga cccaaacgac gttatgctgg attttctaat aaaacaagtt 660
gacgccaccc cgaaagccaa tgctgtgatc atcaacacgt tcgacacatt ggaaagtgac 720
gctctcaacg ccctctctgt catgtttccg cgcatataca cactcgggcc tctccatatg 780
atgttgaata atcccgaggt cgacgaaccc tctaatgcaa tcaaatttaa tctttggaaa 840
gaagactcac attgcctaga ttggctcgat gtgaacgagc ccggatcagt tgtatacgtg 900
aattttggca gctcaacaat tctgactgtt gaacaactaa ctgaattagc atggggcctt 960
gctaacagca agaaaccgtt cctttggatc atcaggcctg atttagtaac tggtgcatcc 1020
tccatgcttc cgcctgagtt cctggtcgag actaaagaca gaagcatgtt agtgagttgg 1080
tgcaaccaag aacaagtgtt gaagcacccc gcgactggag tgttcttgac gcattgtgga 1140
tggaattcga cgattgaaag catttgcagc ggcgtgccaa tgatttgttg gccttactac 1200
gctgagcagc aaaccaactg taggtacagt tgtgtggaat gggaaatagg aatggagatc 1260
attgacaacg atgtgaagag agatgaggtg gaattgctgg tgattaagtt gatggatggt 1320
atcaagggaa agaaaatgaa aaagaaagct atggagtgga agaggaaagc agaagaggcg 1380
gtagcttttg ggggctcttc ctacatgaat ttggataaac ttattagcga cgtgcttttt 1440
ccataa 1446

<210>16
<211>1458
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1620
<400>16
atggcaggtc caaattgcaa gcctcacgcc atcatgatcg cacttcctta ccaaggccac 60
ataactcctt ttgtcaatct tgcactaaaa cttgcttcca atggctttac aatcactttt 120
gttcaccttg aatttatcca ccaaatgttg tctaaagccc ataacgccac taaaactgaa 180
gcagatttat tttcggaagc acgagaatcc ggtctcgaca tacgttacac aacgattgac 240
gatggtttcc ctttggaatt cgacagggct ctccactccg aggagtattg gcactccatg 300

ttgcgagatt tcccgttaca cgtcgatgag tttgttcgaa aagtcgtgga gtcagagcca 360
tttttagagc acttttttggt tacggatact atgtatacat ggcctgcaac cattgcaaag 420
aaacataatc ttgtgaatat ttcgttttgg actgaaccag ccctggtgtt ttctttgtct 480
taccatataa accttctgaa gcaaaatggt cattttccat gtaaagaaaa tattgatgag 540
gaaataaatt acgtaccagg agttgattca ataagtacaa gggatttaat gtcttatttt 600
aaagaaccag gatcagaaac attagagaaa aatgttgtgc tcaaggcatt tgaaggagtg 660
aagaaagctg atttcatctt gcataacaca ttgcaagaac tagaatctga gacactctca 720
gctcttacca aaatgcagcc aaattacgcc gttggaccta ttaatttctc caaacatact 780
cctaaaactg tcaccaagag tctacggtct gaattcgact gcaccaactg gctcgactct 840
aagcctccca actctatttt atacgtctcg tttggtagtt ttattcagac aagcaaagag 900
gtaattgaag aaatcgctta cggtcttctc cttagtgaag ttaactttat atgggtggtt 960
agaacagata gtgtgagttt agaggataac gaggttttgc cggttggatt tagggatgag 1020
gttaaagata gggggttgat agttccgtgg tgtgatcaaa ttacggtttt gtctaatcgc 1080
gcggttggag gattcttgac gcattgtgga tggaactcgg tattagagag tatgtggtgt 1140
ggcgttccta tgatttgtta tccgttaaca tatgatcaac ctactaatag gaaactattg 1200
gttgatgatt ggaagattgg cattaatctt tgcgacggag cgttgattaa tagaaaagaa 1260
attgcagaga agattaaggc cttgatgagt gaaagtactt cagaggggtt gagggaagaa 1320
tctgagaaag ttaagggctt gttgaagaat gcactggaag ttggtggttc atcagagaag 1380
aatttcaata aatttattga ggatttgaag gcaaaaattc aaataatgaa agagcaaatg 1440
cctgctaata ccagttga 1458

<210>17
<211>1443
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1622
<400>17
atgggttcca cagccgaaaa taaacagaaa acccacattg tgtgcatacc ctacccagcc 60
caggggcaca tcagccccat gctaaagtta gccaaactgc tacaccaaaa cggcttttac 120
atcacttttg tcaacacgga gtacaaccac cgccgcctca tcaagtcccg cggccccacc 180
gccctcgacg gattgcccga tttccggttc gttacgatcc ccgacgggct tcctttctct 240
gaagccgacg ccacacagga tatcccttct ctttgtgttt caaccaccaa cacttgcttg 300
gagccctttt gcgagctgct gtcgaacctc aataactccg gcccggacgt gcccccggtg 360
agctgcatcg tatccgatgg tgtcatgagc ttcacgttga aggcggcgga gagatttggg 420
ctgccggagg tgctgttctg gacgacgagt gcgtgtgggt tcttggcgta tacgcagtat 480
aagcatctcg tggagaaagg ctatgtaccc ctcaaagata tgagccaagt aacggatgga 540
tatttgaaaa caagcatgga ctggattcca ggaacgaagg acatccaact aagggacttc 600
ccctctttca tcaggacaac agatccagaa gacatcatgc ttaatttttt aatacaagaa 660
actgatgttg ttccgagagc caaagctgta ataatcaaca ccttcgacat gttagaacac 720
gacgtcctgg aagcgctctc caccatgttt tcacgcgttt acagcatcgg ccctcttcag 780
ctgatgatga attatgttca caacgagtcc cttaaatcca tcagttccag tctatggaaa 840
gaagaaacac attgcgtcga ttggctcgat tcaaaggagc ccgaatccgt tgtgtacgta 900
aattttggca gcataactgt cgtgactgca gaacaactga ctgagtttgc gtgggggctc 960
gctaatagta agaagacttt cctatgggtt attaggcctg atatagttgc tggagactcg 1020
gctatgctgc cccctgaatt cgtgacgggg acaaaagata gaagcatgtt aatcagctgg 1080
tgtaaccaag aacaggtgtt gaatcaccca tcaattggag ggtttttgac gcacagtggt 1140
tggaattcga cgattgaaag tatagtcgag ggagttcctg tgatttgctg gcctttcttt 1200

gctgagcagc aaacaaattg taggttcagt tgcgtggaat gggaaatagg aatggagatt 1260
gataataatg tgaagagaga tgaggttgaa gttttggtga gggaattgat ggatggagag 1320
agggggaaga aaatgaagga gaaagctatg gagtggaaag ggaaagcatt agaggcaact 1380
gcacttgggg gctcttccta cttgaacttg gaaaaactaa ttaaggaggt gcttttgcat 1440
taa 1443

<210>18
<211>1407
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1610
<400>18
atggcatctt ctccccataa ccagccaacc acgccccgcc acgtggtggc cctaccctac 60
cccggccgcg gccacataaa ccccatgctc aacatctgca aagccgtagc ggagaagagc 120
agccacatca acataacaat catcctaacc gaggaatggc tcggcttaat cggctcagcc 180
gacaagccgc cgaacataag ctacgccgcg ataccgaaca ttctgccgtc ggagcacgtt 240
cgcggcgagg atccacatgg tttttgggcg gctgtttggc agaagatgga ggagccggtt 300
gatcggctgc tggacgagct tcggcttaat aataacaagc cggagtttgt gatagccgat 360
gctttcttgc attgggcggc tgacgtggcg ggcaggagga atattccctt ggcatctgtt 420
tggccaatgt cggcgtccac gttcacggtg ctttaccact ttgaccttct cgttgaccac 480
ggacactttc cgatcgacat accagtgaat ggagatgcta ttgtggatta catcccggga 540
ctccctccag ttcgcgtcgc agattttcca aaagacataa gaaaacaaga agacgcatcc 600
ttcgtcctta aactcattcc caactcacca aaattcatca tcttcacttc aatttacgac 660
ctcgaatcca agatcatcga cgctctaaag caaaaatctt ccttctcaat ctacaacatt 720
ggtcctcatg cttcctattc caaactcaaa cacatcctca actcggataa aatcacgaaa 780
cctgatcaag ataaccccga ctacttaaaa tggttagatc tccaacctcc caactccgtc 840
ttgtacattt cactcggcag tttcctatcc atttccgcag cccaaatgga tgaactcgca 900
accggaatac gaaactctgg tgtccgcttt ttgtgggtgg cacgtggcga aacaaaccgg 960
ttgaaagaga tttgttgtga tcatgaaaag gggctgatca tagaatggtg cgatcaaatg 1020
caggttcttt ctcattcttc ggttggtgga ttcttgtcgc attgtggttg gaattcgact 1080
aaagaggcgt tgatggccgg ggtgccgttt ttgactattc caattatgtt tgatcaagtg 1140
tctaacgcga aggcggtcgt ggaagattgg agggtggggt ggagggtggt gaatgagttt 1200
aatgaagaag agttggtggg aggagatgag attgcgaata ttgtgaggag gtttatggat 1260
atggaaaatg gtgagaggaa agagttgacg aaaaatgtga aagaggtgca gaagatttgt 1320
gcgagagagt tcgaagatgg agatggacag tcgtttgagt ttaatgttga aagtttggtt 1380
caattgattc tgcaattggg tccgtaa 1407

<210>19
<211>1428
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1609
<400>19
atgaacaaca caacccaaca acaaacagta gcattagcac tagcacctca ctgtttaatc 60

gtcccattcc cattccaagg ccacattaac cccttactcc aattcgccaa acgcctcata 120
actcaccaca acaaaaacct ccaaatcaca ttcgcactca ccaaattcat cctcaccaac 180
ctctcctccg gtgccggaga atcatccttc tctctccggt caatctccga cggcttcgac 240
gccggcggcc gcgctcaggc caactccggc gccgaatacc tctccaaatt ccgcgagatc 300
ggatctcaaa ccctaaccga acttatccaa gacctatccg aatcgggtcg acccgttgac 360
tgcgtggtct acgacccgtt cgtaccttgg gccttagatg ttgccaaggg taaattcgga 420
atttcaacgg cggcgttttt tacgcagtcg tgtgcggtgg ataatatata cagtcgggtt 480
tataacggcg atttggagct gccgttgccg gagaatgagg tggttagggt tccgggtttg 540
ccggagatgg agccgtttga gatgccgagc tttgtgtatt taaacgggtc gtacccgtcg 600
agttttgaga tggttgtggg tcagtttagg aatgttgatg aggcggattg ggtttttgtc 660
aacacttttt atgagttgga gaaagaggtc attgactgga tgtcaaaatc ttggcgagtg 720
aaagcaattg gacctaccat accatcaatg ttcatggaca agagattgca agaggacaaa 780
tcatacggtc ttagcatgtt caagcataca acaaatgact gcataaattg gctcaacgga 840
aaacaatcaa aatccgtcat ttatgtcgca tttggaagtc ttgcagaatt atcccacgac 900
caaactcaag aactggcaca cgccttaaca acctacgaca aacacttctt atgggttgta 960
cgatcatcgg aagaagctaa gcttccccaa aattttgcta acgaaacatc taagaaaggg 1020
ttgatagtgt cgtggtgccc tcaattagag gtcttgtcgc acgaggccat cggttgtttc 1080
gtgactcatt gtggttggaa ttcaacgctc gagggattga gtttgggggt gcctatggtg 1140
gcgatgccac agtggacgga tcagagtacg aacgctaagt ttatcgtgga tgtttggggt 1200
gtgggtgttc gggctaaggt ggacgagggg ggattagcga ggcaagatga gatagttcgt 1260
tgcttaggga gcgtcatgga aggggagaac ggagaaaaga taagaaagaa tgcgaatgaa 1320
tggaaggaac gggcgtgcaa tgcagttgat gaaggggggga gttcagacaa aaatattgaa 1380
gaatttgtta ctacgttgat aagttcccat gacttgcgtc aagagtaa 1428

<210>20
<211>1425
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1617
<400>20
atgtctagtg agagccaaat aaacttagtg ttcatccctc tccctgtaaa gggacacatt 60
gtctcaacgc tagagacggc aaagctactc gtcgatcgaa acaaacgcct caccatcaca 120
atcctcctca tgaagctgcc agtcgacgcc aaggtagatg attccttcac aaaaaatccc 180
tcctgctctc aaataacttt tgtacatctc cctcgaatcg agcacagttc catggaacca 240
ccgggaactc ccgaatcctt tgtacacagg ttcgtcgaga gccaaaaatg tctcgtaaga 300
gatgcggtgg ttaaagcaac ggagggctca aaatcaaaca ggctagccgg atttgtaatc 360
gacatgttct gcaccccgat gattgatgtg gccaatgaat ttggcgtccc gacatacgtg 420
gctttcacgt ccggggccgc aactctcggg ctattgttcc atttgcagag tcttagagat 480
gaatttaatc aggacgtgaa ggagtacgag aactcggaag ttgagatatc gatcccggct 540
tatgttaacc cgttcccttc caaatccttg ccgtctcctg tcttcaacga ggacggtgtt 600
tttcttagtc ttgcaaaggg gttcagagag gctaaaggta tattgatcaa caccttttta 660
gaatttgaat cccatgccat taaatcgctc tccaacgatg cgagaatccc gcctgtttac 720
cccatcgggc cagtaattca cgccacggaa gataatgcaa acaaaggaaa gcaggacgaa 780
atcatcgcgt ggcttgacga gcaacctgat tcatccgtcg tgtttctttg cttcggaagc 840
gctggatgct ttgaagaaaa tcaagtgaag gagattgcag tggcgctcga caaaagtgga 900
taccggtttt tatggtcatt gagaaagccg cctcccaaag aaaaagcgga gtttccaggg 960
gagtacaaag attttaatga agttttacca gaagggttct tacaacgtac gtccgggaga 1020

ggtaaggtaa taggatgggc tccgcagatg gccgtgttgt ctcacaatgc ggtgggagga 1080
ttcgtgtcgc attgcggctg gaactcgacg ttggagagtg tttggtgcgg agtgccaatg 1140
gccgtgtggc cattggcggc cgagcaacat gcgaacgcgt tccagttggt gaaggagttg 1200
ggaattgcgg tggagattaa gatggattat aggaagaaca gtggtgtgat tgtggaggca 1260
aaaatgattg agaaaggaat cagggagttg atggacccgg aaaatgagat aaggggtaat 1320
gtgaaagtga tgaaaaagga gagtaggaNa gctgtcgtgg atggtgggac ttcttttgat 1380
tacttggatc gttttgttga aactgtcgtg aataatgttt tgtga 1425

<210>21
<211>1446
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1615
<400>21
atgggttccg tagccggaaa cagttacaaa cggcctcatg ctgtgtgcat acccttcccg 60
gcgcaggggc acatcaaccc catgctgaag ttggccaaac tcctccacca aaagggcttc 120
cacatcacat tcgtcaacac agagtacaac caccgccgct tgctcaagtc cctcggcccc 180
gacgctctcg atggcttgcc ggatttccga ttcgcaacca tccccgacgg tcttcctccg 240
tctgacgcgg acgtcactca ggatgttcct tctctttgta tgtccaccac taacacttgc 300
ttggagccct ttaccgagtt gctgttgaaa ctcaataact ccggcccgga cgtgccaccg 360
gtgacctgca tcgtctcgga tggtgtcatg agcttcacat tgaaggcggc ggagaggttt 420
gcgctgccgg aagtgctgtt ctggacgacg agtgcgtgtg gtttcttggc gtacacgcag 480
tataagcgtc tcttggagaa aggctatgtc cctctcaaag atatgagcca gttaacaaat 540
agctatctgg aaacaaccct cgactgggtt ccaggaatga aggatatccg attaagggac 600
ttcccatcat tcatcaggac aacggatcca aaagacatca tgtacaattt cgtattacaa 660
gaaaccgacg ctgtctccag agccaaagct ctgatcatca acacctttca tacattggaa 720
cacgacgttg taaatgccct ctccaccatg tttccacgtg tttacaccat cggctctctt 780
cagctgatgt tggaccaagt tcatgacaag agccttaacg ccatcaactc caatctctgg 840
aaagaagaat cgcaatgcat cgattggctc aattcaaaag agcccgaatc cgttgtgtat 900
gtgaatttcg gtagtgtcac tgttgtgact gctcaacaac tgacggaatt tgcgtggggg 960
cttgcgaaca gcaacaagac ttttttatgg gttattaggc ctgatatagt tgttggagac 1020
tcggcaatgc tgccccctga attcttgacg gacacggaag acagaagcat gctaataagc 1080
tggtgtaacc aagaacaggt gttgaggcac ccttccatcc gaggattttt gacgcacagt 1140
ggttggaact cgacgcttga aagtattgtc agcggagtgc ctatgatatg ttggcctttc 1200
tttgctgagc aacagacaaa ttgtaggttc agttgcgtgg aatgggaaat aggaatggag 1260
attgacaata atgtgaagag agatgaggtt gaggtgctgg tgagagagtt gatggatggt 1320
gaaaagggga agaaaatgaa gaagaaagct atggagtgga agatgaaagc agaagcagca 1380
gctgcccctg ggggaccttc gtctttaaat ttggaaaaac ttattgagga ggtgcttttg 1440
caataa 1446

<210>22
<211>1308
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>

<223>pSPB660
<400>22
atgaaggctc atgcagtgat gcttccttgc cccgtacaag ggcacttaaa tcctatgctg 60
aaactggcca aaatattgca ttcaagaggc ttcttcatca cattcgtgaa cacggaattc 120
aatcacaatc gtctagtgcg tgcgagaggc cccgaatctg ttaaaggtcg cgatgatttt 180
cagttcaaaa ccatacctga tggactaccg ccttttgata aggacgcaac gcaagacata 240
cctcaactgt gtgattctct tcaaaagaat ggtcttcctc cattgttgga cctcattaaa 300
agtattaatg attcaccgga ctgtccaaat gttacctgta tagtgattga tttggccatg 360
agtttcgctc ttgatgcggc cgaggtgttc aaaattccca cggtgtactt ttcgccaact 420
agtgcttgtg gattcatggg gttttgcaat tatgaagagc ttgtgaatcg aggattgttt 480
ccacttaaag atgaaagtca aataactaat ggctatcttg ataccaaact agactgggtg 540
ccagggatga agaacattag gctcagagat tttcctagtt tcatccgaac gactgatcca 600
gatgatatca tggtgaactt catgattttt aacatgaaga atgcgcctcg tgcaaaggct 660
gtggtagtca acacattcga tgaattggag aaagatgtat tggaggccct aagtaaaaaa 720
tttgatcatg ttttttccat aggcccactc caattgatgg agaaggcttt ccaaaagcct 780
gaggtaaaat ctataggatc aagcttgtgg aaagaagaca acacgtgcat cgcctggctc 840
aacggcaggg agccaaattc tgtgttgtac gtgaactttg gaagcatcac agtgttgtca 900
cctcaacaac tattggagtt cgcatggggc ctagccaata gcaaccatta ctttttgtgg 960
atcataaggc cagatttggt aagtggagaa tctgcgattt tatccgaaga gtactcaaag 1020
gaagttgaag ggcgggcgat gatggtgcgt tggtgctctc aagagcaagt attggcccat 1080
ccttcggtag gtggattctt gacacattct ggctggaact cgactatcga aggaatgtca 1140
gaaggtgttc ctatgatttg ttggcctttt tttgctgacc aacagaccaa ttgtcggtat 1200
gcatgcacgg agtgggagat tggaatggag attgaaggag aggttacgag ggataaagtg 1260
gcggatttgg tgaaaatatt gatggaggag ggaaggggag agcgatga 1308

<210>23
<211>1506
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB658
<400>23
atggccattc atgaacaaaa acctcacttt gtcctgttcc ctttcatggc acaaggccat 60
atgattccca tggtagatat cgccagatta ctcgcgaagc gcggtgtcac aatcaccatt 120
ctactcacac cccacaatgc caacagggtc aaaacagtca ttgctcgtgc aatcgattca 180
ggactaaata tcaatgtcat ccacttcaaa tttccatccg ttgaggtcgg attgcccgaa 240
ggttgtgaga atttcgatat gctccctgac atcaatggcg cattgcagtt tttcaaagcc 300
actttcatgt tacaagaaca ggtcgaagag ttgcttccaa agctcgagcc tcttccgagc 360
tgcctaattg ctgatatgtg ctttccatgg acaacaaatc ttgctttgaa gttaaatgtt 420
ccaagaattg tgtttcacgg gacaagttgc ttttctctcc tatgtatgca cgttttagga 480
acttctaagg atttcgaagg tgtgactaac gaaacggagt acttccttgt gcctggatta 540
ccagataaaa tcgaaataac caaaattcag cttaggggca cccttattca aatgaattca 600
gactggacga agtttcgtga tgaggtgcga gaggctgagg taaaagcatt tggaacggtg 660
gccaatactt ttgaagattt ggaaccagag tatgtcaaag aatacagcag agttaaaggc 720
aaaaaagtct ggtgcatagg tcctgtttca ttatgcaaca aagatggcat agacaaggcc 780
gaaagaggta acatggcttc aatcgacgca caccattgct tgaagtggct caattcacac 840
gaacaaaagt ctgttattta cgtctgcctt ggaagcatat ctcgcctcgc tacttcacaa 900
ctgatagagc ttggattggc tttagaagca tcaaacagac cttttatttg ggtagttaga 960

gatccatcac aagaacttaa aaaatggttt ttgaatgaga aatttgagga aagggtaaag　1020
gatagaggcc ttttgatcaa cggttgggcg cctcaagtgc tcatactttc ccatccatct　1080
gttggagggt ttgtaacgca ctgcggctgg aactcgatgc ttgaaggggt tacttcaggc　1140
ttgccgatga taacgtggcc tgtatttgct gagcagtttt gtaatgaaaa gtttattgtt　1200
cacgtgatca agactgggat aagagtgggt gttgaagtgc ctatcatctt tggagatgaa　1260
gaaaaagtcg gagttttggt gaagaatgat gagataaaga tggttataga taagttgatg　1320
gatggaggag aagagggaga agagagaaga gagagagctc aaaagcttgg agaaatggca　1380
aaaaaggcaa tggaggaggg tggttcttct tatcataatt tgacatcggt catgcaagat　1440
gtcatgatgc aacaagctaa taatggagat caatatgaag atggtgttac agttataaat　1500
acatga　1506

<210>24
<211>30
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer 1617BamHINcoI-FW
<400>24
gggggatcca tggctagtga gagccaaata　30

<210>25
<211>36
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer 1617XhoIKpnI-RV
<400>25
cccctcgagg gtacctcaca aaacattatt cacgac　36

<210>26
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer 1617-F
<400>26
atgggagaag aatacaagaa aaca　24

<210>27
<211>26
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>

<222>
<223>Primer 1617-R
<400>27
taaaatttgg tagttaaacc gatgta　26

<210>28
<211>1386
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1721
<400>28
atgctgagcc tcgccaaaat tctgcaccaa aagggattcc atatcacttt cgttaacact　60
gaatttaacc atgaacgcct cctgagaacg agaggcccga attcccttga cgggttgcct　120
tcgtttcgat tcgagacaat tcccgacggt cttccgccat cagaccccga tgctacacaa　180
aacgttgcat tattgtttga gtccagcaca tccaaatgct tagctccatt cagggacctt　240
cttgctaagc taaaccacac cgacgtgccg ccagttactt gcatactatc cgacttaatc　300
atgagcttca ctcttgaagc tgctcaagag ctcagcatcc ctgatgtcct tttttggacc　360
gctagcgctt gtggatacct cgcttatgca cactatgcca cgcttattga aaaaggattt　420
acacctttca aagatacgag ttgcttgacc aatgggtatt tggataccgt tattgatgat　480
attcctagtc tggaaggcat acgtctgaga gacattccaa gttttatcag aacaactaat　540
ccagatgaca ttttgatgaa ctttgtgttg cgagaaacag agagagctag aaaaggttcc　600
gccgtaatct ttaacacgtt cgagtgcctc gaggttgaag cattaaacgt actttcatcc　660
atgttgcctc cagtttacac agttggaccc ctgcatttgg ttgaaaagca tgttggtcac　720
aaaggattgg aggtgcttgg atcaaattta tggaaagaag agccaaaatg tctcgaatgg　780
cttgactccc aaattcccaa ctcagtggtt tacgttaatt ttggaagcat cgctgtcatg　840
acaactgacc aactgattga gttttcttgg ggtcttgcta atagcaacat atccttcttg　900
tggattataa gacctgacct tgtctcaggg gaaaacgctg ttcttccacc cgaatttctc　960
gaagccacaa aagaaagagg gtgtttagca aattggtgcc ctcaagagaa agttcttagc　1020
cacccatcca tcagaggatt cttaactcac agcggatgga attcaactct tgagagcatt　1080
tgcagtggag ttccaatgat cagttggccg ttcttcgccg aacaacagac taactgttgg　1140
ttttgctgca caaaatgggg cataggcata gagctagaca atgatgtcaa aagggataaa　1200
gtggaagacc ttgtgcgcga attgatgtct ggggataaag ggaaagagat tatgaaaatg　1260
gctatggagt ggaagaagct ggccgaagag tctgcccaga gttcatcttt taagaatcta　1320
gagaaagtga ttcatgaagt gcttttacca ccactacaag tgtgggatcc taaggattcc　1380
acctaa　1386

<210>29
<211>1374
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1724
<400>29
atggaggaca ctatcgttct ctacgcttca gcagagcacc ttaactccat gctactactc　60
ggcaaactca tcaacaaaca ccaccccaca atctccgtcg ccattatcag caccgcccca　120

aacgccgccg ctagttccgt cgccgacgtg gcggccatat cttatcagca actcaaaccg 180
gccactctcc cttcggatct aaccaaaaac ccaatcgagc tcttcttcga aatcccacgt 240
ctacataatc ctaacttgct cgaagcgctg gaagaactgt cactaaaatc aaaagtaagg 300
gcatttgtga tagatttctt ttgcaatccc gcatttgagg tttcgactag cttgaacata 360
cccacttact tctatgtcag cagcggcgcg tttgggctat gcgggttctt gcattttccg 420
acaatcgacg aaactgtcga aaaagacatc ggtgaactga acgatatctt ggagatcccg 480
ggttgccccc cggttttgtc ctcggatttt ccgaaaggta tgttctttcg caagagtaac 540
acttacaagc atttttttaga cacggcgaaa aacatgagga gagcgaaagg gatcgtggtg 600
aacgccttcg acgcgatgga gttccgagct aaagaagccc tcgtcaacaa tctgtgcgta 660
cccaattcgc caactccccc agttttctta gtcggcccat tggtcggagc aagcacaact 720
acgaaaacca caaacgaaca gcacgaatgc ttgaaatggc tggacgtgca gccagacaga 780
agcgtgatct tcttatgttt cggtaggagg ggtttgttct ccgcagacca attgaaggaa 840
atcgcaattg gtctggagaa cagcggccac aggttcctgt ggtccgtgcg ttgcccacca 900
agtaagccta actcttataa cactgatccg gacctggacg agctcctgcc cgaggggttt 960
ttgtccagga ccgagacccg gggtttcgtg atcaagtcgt gggcgcctca gaaggaggtg 1020
ctgagccatg gcgcggttgg agggttcgtg acgcactgtg ggaggagttc gatattggaa 1080
gcggtgtcgt ttggggtgcc gatgatcggg tggccgatat acgcggagca gaggatgaat 1140
agggtgttca tggtggagga gatgaaggtg gcgttgcagt tggatgaggt ggaggaaggg 1200
ttcgtggcgg cggtggaatt ggagaagaga gtgaaggagt tgatggattc gaagaatggg 1260
agagcggtta ggcagagagt gaaggagatg aaagtggcgg ctgaggtggc ggttgaaaag 1320
ggtggttcgt cagttgtggc gttgcaacgc tttgttgata tggtggtttc ttaa 1374

<210>30
<211>1362
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1723
<400>30
atggaggcag acaaagaaaa tctcaagatt ttaatgttcc catggttggc tcatggtcat 60
atatttccat ttcttgagct agccaaaaga atcttgaagc gaaaaaactg gcacatatac 120
ttgtgtacca cagccataaa cttcagttct atcaacaact tcattgaaaa atataagttg 180
gagaactcaa tagaagtagt agaactccat atagaaccat cccctgaact tccacctcat 240
taccacacta caaagaattt gccaacaagt ctcaattcta ccctattaaa ggccattcag 300
acgtcgaatt cgagcttctc agacatcatc agaacattga aacctgaact agtgatatat 360
gatgtgtttc aaccttgggc tgccaagatt gcttcctcac aaggtattcc tgctgtttat 420
ttttctagct ttggaggggc accattatca cttatgcatc atcaccacac gtacggaaaa 480
cccgaatttc ccttccaagc aatagttgtt gaggacatcg aactggaaag tttgctctct 540
ttgtttgatt tcttgtatgc caacatattt gaagtggatc aagattatct ttttgggaat 600
ttcaagcaat cttgtgagct tgttttgtta aagagtagta aagggattga gaggaagtac 660
atcgattatc tttcatcttt gtctcagaaa aaaatattac ctgttggacc actagtcaca 720
gttgacaata agaccaatga ggagaattcc gagatcatga attggttgag caagaaaaaa 780
caccattcaa ctgtctacat ttccttcggt agtgaatact tcctgtctaa agaagagatt 840
gaagagatag caaaagggct tgagctttgt gatgttaact ttatatggat catcagattt 900
ccagttggag tgaccgttaa cttagaagaa acactgcctc aaggtttcct tcaaagggtg 960
aacgaacggg ggatggttgt ttcaggatgg gcaccacaga gcaacatatt agcacatcca 1020
agcacaggag gctttgtgag tcactgtggg tggagttcta tcacagaaag cgtatatttt 1080
ggtgttccgg tcatagggat ggcaatgaaa cttgatcagc caataaacgc cagaatgtta 1140

tcagaggctg gtagttgtgt cgaagtcaaa agatatgaaa atgaagtgtt taggggagaa 1200
gagatagcga aggcgataaa gaaggtgatt gttgaggaca gtggagaaag gctgcggcaa 1260
agagctttag aattgagcga gaagatgaaa atggaagagg aaaatgagat ggatgaagta 1320
actgagcagc tgtgggagct ttgcttgacg aaaaaacggt aa 1362

<210>31
<211>1437
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB1719
<400>31
atggaacctc atatagttat attcccgttc atgtccaaag gccacacaat ccctctcctc 60
cacctctccc acctcctcct tagtcgcgga gtacgcgtaa cgatcttcac cactgcacaa 120
aaccaccctt tcatcgctca acatgtccca aaaacaaata atgttaccat cattgaccta 180
ccgttccctg ataacatccc tggaatttca ccaggaacgg agagcacgga caaactcccg 240
tcgatgtctc tcttcgtccc gttcgtgaac gccgctaaat cgatgcaacc gttcttcgaa 300
gatgagcttg agaaaattca ttcaggggtt agttgtgtta tatcggatgg ttttcttcat 360
tggacgctga aatcagcatc caagttcgga attccacgac tgagtttcta cggtatgagc 420
tactatgcct tgacaatttt tcgagtcgct atctcaaaca agttaatatc attgcacgag 480
tcaccgcacg aggcattcac cttacctagt tttccttgga ttaaactcac tagagatcac 540
ttcgacaaac cacttgatca acgtgaacca aatggtccgc aatttgactt tttcatggaa 600
gcaacgacag ctactgtgaa tagctatggt ttcttagtga atagcttcta tgagcttgaa 660
ccaactttcg cggattacta tgacaacaat tacaaaccca aggcgtggag tgtcgggcct 720
ctctgcctcg cacaaacgcc aaagaatgat aatctctcgt cgaagcctga gtggattcat 780
tggcttgacc aaaagttgga acaagatcgc cctgttttgt acattgcatt cggatcacaa 840
gcagaaatta cactagaaca gttacatgaa atctcacgag ggttggaaga gtcaaatgta 900
cacttttgt gggttttaag gaacaatgga gttgaactaa gtgatggatt tgaagacagg 960
gttaagaata gaggaattgt agtaaaagaa tgggttgatc aaagagagat tcttgaacat 1020
gaaagtgtaa aaggctttct aagtcattgc ggctggaatt cggtaatgga aggtatatgt 1080
gcggaggttc tgattcttgc gtggccaatg atagcggagc aacacttgaa tgcaaagatg 1140
gtgagtgaag aaataaagat tggtttgaga gttgaaacgg ttgatggaac ggcaaaggga 1200
tttgtgactg cggcgagttt gacgaaggcg gtgatggaat tgatggaggg tgagaagggg 1260
aaggaattga gggagaatgt gaagaaagtg gcgggggcag cgagggaagc ggtggtggaa 1320
ggtggttcgt cgtggaatgg tttgaatgaa ctcattgatg aggtgtgtag gcataaggaa 1380
atgagtggta gttctaaagt tgatgaaaac aagagggaaa ttaaggatat taattaa 1437

<210>32
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer 1725-NcoI
<400>32
cccatgggag aagaatacaa gaaa 24

<210>33
<211>26
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer 1725-KpnI
<400>33
ggtacctata aaatttggta gttaaa 26

<210>34
<211>1080
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>GAPDH
<400>34
caccgattac atgacgtaca tgttcaagta cgacagtgtt catggtcagt ggaaacacca 60
cgagttgaag gtacaggatg agaagaccct tctgtttggt gaaaagccag taagagtctt 120
gtcaactggt gtcttcacgg acaaagataa ggctgctgct cacttgaagg gtggtgccaa 180
gaaggttgtg atctcagcac caagcaaaga tgcaccaatg tttgttgtgg gtgtcaatga 240
gaaggaatac aaaccagagt tggacattgt ttccaatgct agttgcacta ccaattgcct 300
tgccccttg gccaaggtca ttaatgatag atttggaatt gttgagggcc tcatgaccac 360
cgtccactct attaccgcaa ctcaaaagac tgtcgatggg ccatcgagca aggactggag 420
aggtggaaga gctgcatcgt tcaacattat ccccagcagc actggtgcag ctaaggctgt 480
tggtaaagtg ctcccagttc tcaatggaaa gctaacggga atggccttcc gtgttcctac 540
tgtcgatgtc tccgtagtgg acctcactgt caggctcgag aaagaggcca cttatgatga 600
gatcaaagct gctatcaagg aggaatccga gggcaacctt aagggcattt tgggctatac 660
cgaagatgat gtggtgtcaa cagactttgt tggtgatagc cgatcaagca ttttcgatgc 720
caaggctgga attgcattga gcaagacgtt tgtgaagctt gtgtcgtggt acgacaacga 780
atggggttac agttcccgtg tgatcgacct gatcgtgcac atggcctcag tttctaaggc 840
ttgatcgatg atctgcttag gccgtgaagc agcttttgtc ttatcgcatc ttttctgagt 900
ttgtaataat gggcttttgt gttatttgca gcctaatttt gcagtttgca aatttatggt 960
ttttggttat gttttgctga aacctatttt attacccttt cgcgttgggt tattgaatgt 1020
gaactctttt tactgatgtg tttaacgttc tctcttttaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1080

<210>35
<211>20
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer AmGAPDH-F
<400>35
tgttgctgtt aacgatccat 20

<210>36
<211>18
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer AmGAPDH-R
<400>36
agctcttcca cctctcca　　18

<210>37
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer AmAS-F
<400>37
atgttcaaaa atcctaatat ccgc　　24

<210>38
<211>25
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer AmAS-R
<400>38
ttagccatca agctcaatct tgaca　　25

<210>39
<211>16
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>M13 reverse primer
<400>39
aacagctatg accatg　　16

<210>40
<211>24
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>

<222>
<223>Primer ThDFR-NcoI
<400>40
gctttaccat ggagtaatga gctt　24

<210>41
<211>1367
<212>DNA
<213>
<220>
<221>
<222>
<223>pSPB266(ThF3H)
<400>41
gtatgtatgt atgtatgcta tatacgagtc gataaagttg atcgttttca ttttcgacaa　60
atacaaacct cgtgagagaa tcttctcgat catatggcac gagcaggacc actaacccta　120
acttcgctag cgctcgagaa atcgctgcat gaaaagttta taagggacga agacgagagg　180
cctaacttag catacgatca atttagcagt cagattccat tgatctctct ctctgggatc　240
gacgatgaat gtaataagag gaaagagctg tgcaagagaa tagcgcaggc atgcgaagat　300
tggggtattt ttcaagtgat cgatcatggg atcgatttga aactcgtcaa cgatatgact　360
cgtttggctc gtgagttctt cgatttgccc gacgaagaga agctgaggtt cgatatgtct　420
ggtgggagaa aaggaggttt cattgtttcg agccaccttc agggcgaggt ggtccaagac　480
tggcgcgaga tcgtgaccta cttcacatac cctatcaaag gccgtgacta ttccctgtgg　540
cccgacaagc ccgaggcatg gcgggccgtg acagagacct acagctcgca gctaatgtgc　600
ctgggctgca aattgctagg aatcctatcc gaggcaatgg gcctcgaaag agaagcgctg　660
accaaggcct gtctgaacat ggaccaaaaa gttgtggtca acttttaccc aaaatgccct　720
cagcccaatt tgacattggg cctgaagagg cactcggacc caggtttgat cactctgctg　780
tttcaggata acgttggcgg gcttcaagcg actcgagacg gcgggaagtc gtggatcacg　840
gtccagcccg ttgagggtgc attcgtggtc aatcttggtg attttgctca ttacttgagc　900
aatggaaggt tcaagaacgc ggatcatcga gcggtggtga attcaaacac gaatagaatg　960
tcgatcgcga cgtttcaaaa cccatcgcca gaggctatcg tgtaccctct caagatcgga　1020
gacgacggga agcccattat agaaaagccc atcacttatg gagaaatgta caagaggaag　1080
atggctaaag acattgaact tgccaagctc aagaagctag ccaaggaaca aaagttgcaa　1140
gaagaagttg ttaataatgt tgaagatcat catcttaaca atgggaaaac taaataggag　1200
gttaaggtct ttaaggaaac tgacgttgtc ttgtgattgt tatatattct ctatgtcgta　1260
ttcgtcttaa ggttgtcaga tgaaaatatc gaccatgtta ggtatttaat ttatatgaat　1320
tgtattgcct agtcggccat attatgatta aaaaaaaaaa aaaaaaa　1367

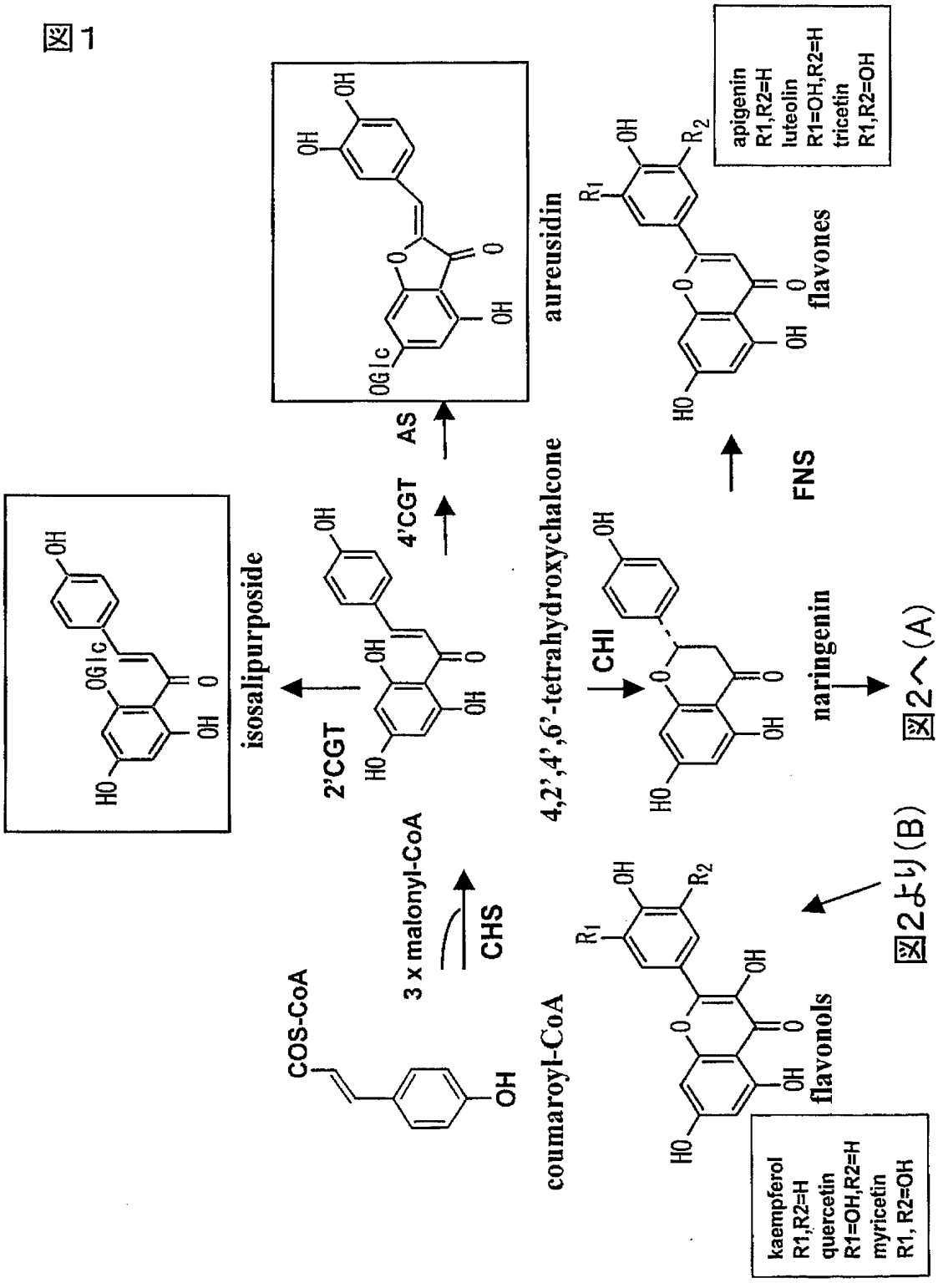
<210>42
<211>22
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer ThF3H-SalI-1
<400>42
ttctctgtcg acgcccattg cc　22

<210>43

<211>22
<212>DNA
<213>Artificial Sequence
<220>
<221>
<222>
<223>Primer ThF3H-SalI-2
<400>43
cgccgtgtcg actcgcttga ag　　22

【書類名】図面
【図１】

図1


isosalipurposide
2'CGT
4'CGT
AS
aureusidin
4,2',4',6'-tetrahydroxychalcone
CHI
FNS
flavones
apigenin
R1,R2=H
luteolin
R1=OH,R2=H
tricetin
R1,R2=OH
naringenin
図2へ(A)
coumaroyl-CoA
COS-CoA
3 x malonyl-CoA
CHS
図2より(B)
flavonols
kaempferol
R1,R2=H
quercetin
R1=OH,R2=H
myricetin
R1, R2=OH

【図２】

図2

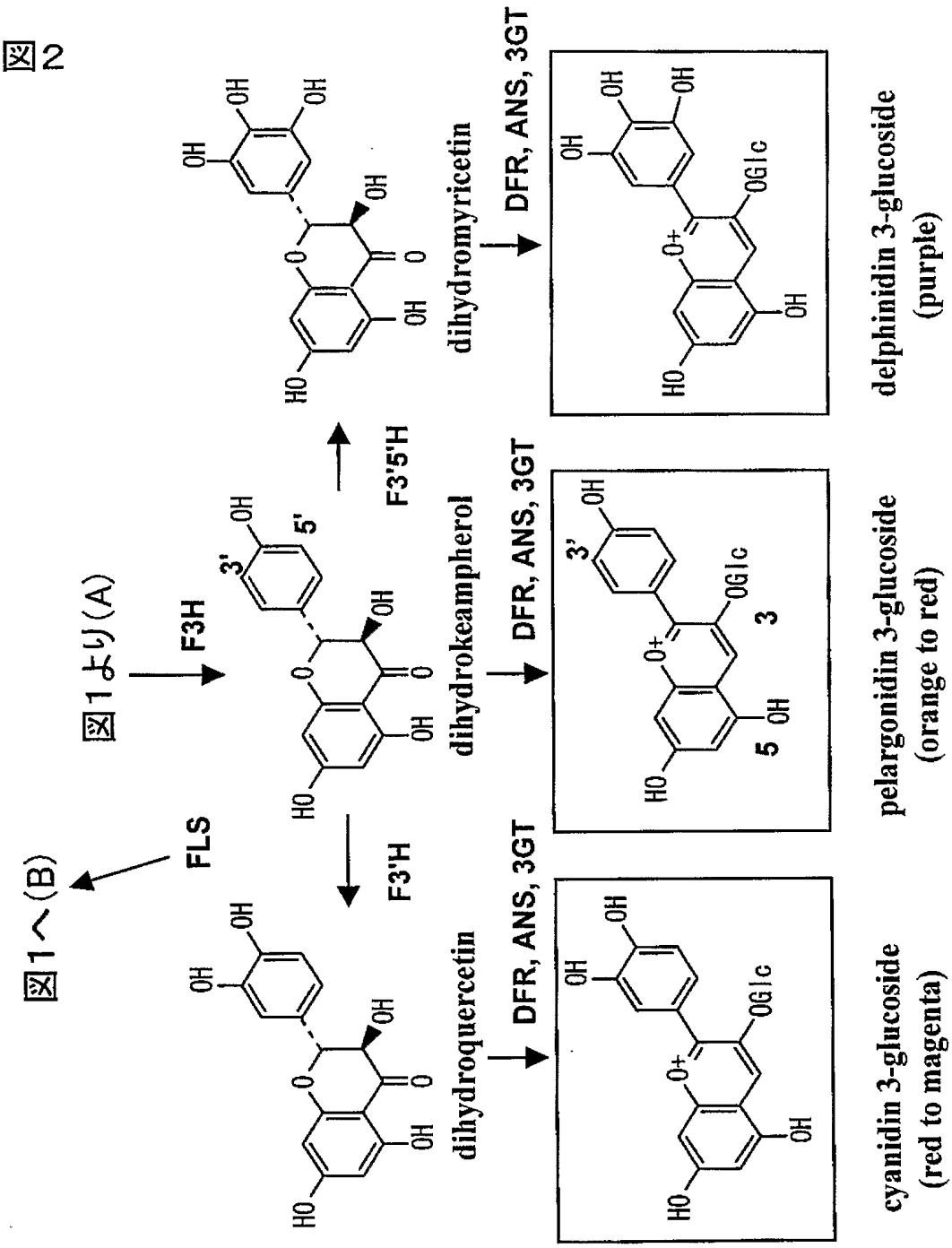
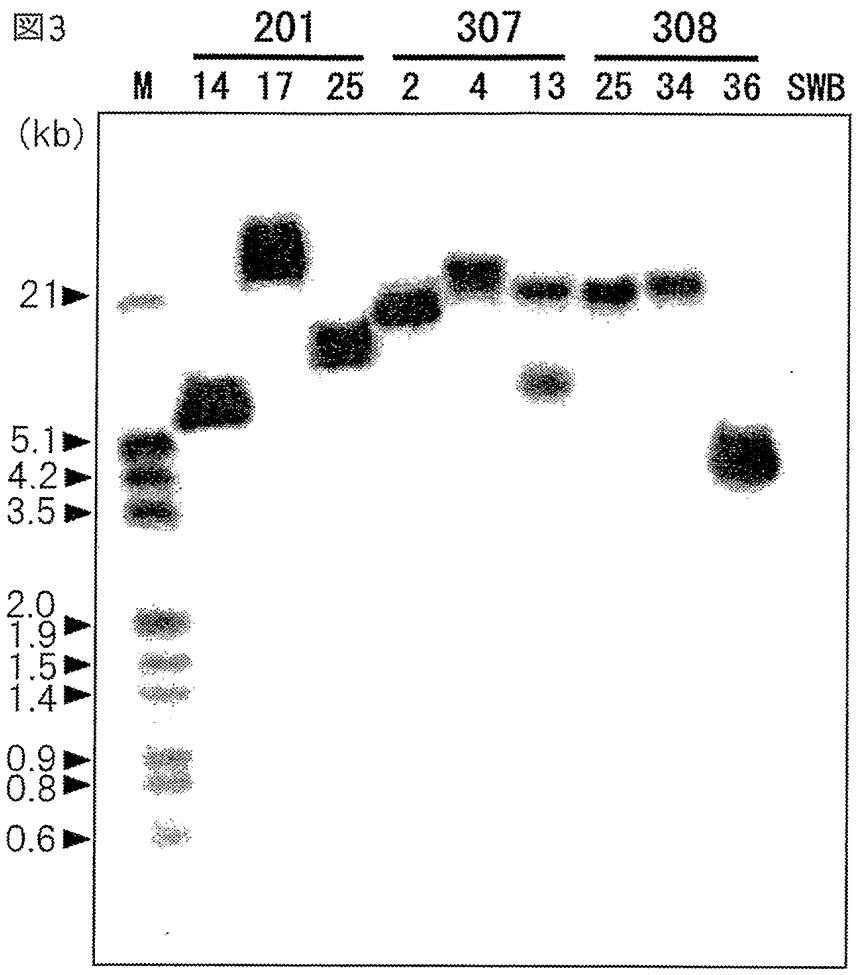


図1より(A)
F3H
dihydrokeampherol
F3'5'H
dihydromyricetin
DFR, ANS, 3GT
delphinidin 3-glucoside
(purple)
DFR, ANS, 3GT
pelargonidin 3-glucoside
(orange to red)
FLS
F3'H
dihydroquercetin
DFR, ANS, 3GT
cyanidin 3-glucoside
(red to magenta)
図1へ(B)

【図３】

図3


201
307
308
M
14
17
25
2
4
13
25
34
36
SWB
(kb)
21
5.1
4.2
3.5
2.0
1.9
1.5
1.4
0.9
0.8
0.6

【書類名】要約書
【要約】
【課題】　カルコンの4’位に糖を転移する活性を有するタンパク質をコードする遺伝子の提供。
【解決手段】　例えば、配列番号：２に示すアミノ酸配列をコードする遺伝子を提供する。この4’位CGT遺伝子とオーロン合成酵素を、本来オーロン合成能のない植物において共発現することにより、オーロンを蓄積することに成功し、花色が黄色味を帯びた色に変化した。さらに、両遺伝子の発現に加えて、宿主植物自身のフラボノイド色素合成系を制御することで、より鮮明な黄色の花を得ることができた。
【選択図】　なし

特願２００３－４２００４６

出　願　人　履　歴　情　報

識別番号　　[０００００１９０４]

１．変更年月日　　１９９０年　８月１３日
[変更理由]　　新規登録
住　所　　大阪府大阪市北区堂島浜２丁目１番４０号
氏　名　　サントリー株式会社

特願２００３－４２００４６

出　願　人　履　歴　情　報

識別番号　［５０２２７５９４２］

１．変更年月日　２００３年　４月２８日
［変更理由］　住所変更
住　所　東京都千代田区平河町二丁目１３番１２号
氏　名　サントリーフラワーズ株式会社